

PARTE XI

BIOFILM

SECCIÓN 1: FORMACIÓN

SECCIÓN 2: DISRUPCIÓN

Autores: Mark Smeltzer, Manjari Joshi, Mark Shirtli ff, Daniel G. Meeker, Jeffrey B. Stambough, Janett y M. Harro

PREGUNTA 1: ¿Cuál es el ciclo de vida del biofilm y el mecanismo de su maduración?

RESPUESTA: Un biofilm puede definirse como una comunidad sétil de microbios caracterizada por organismos que están conectados a un sustrato, a una interfaz o uno a otro, están englobados en una matriz de sustancia polimérica extracelular, y exhiben un fenotipo alterado con respecto al crecimiento, expresión génica y producción de proteínas. El ciclo de vida de la infección por el biofilm generalmente sigue los pasos de la adhesión (interacción entre las bacterias y el implante), la acumulación (interacciones entre las células bacterianas), la maduración (formación de una estructura 3D viable) y la dispersión/desprendimiento (liberación de la biopelícula). El ciclo de vida del biofilm es variable dependiendo del organismo involucrado. Existen características en el ciclo de vida de la formación de biofilm. Estos incluyen la adhesión, la proliferación/acumulación/maduración y la dispersión. La biopelícula se puede encontrar como adherente a una superficie o como agregados flotantes.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte (esta es una revisión científica)

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Para responder a esta pregunta, los autores buscaron en PubMed y Google Scholar entre enero de 1950 y agosto de 2018. Las palabras de búsqueda incluyeron: biofilms, formación de biofilms, ciclo de vida del biofilm de estafilococos, microorganismos grampositivos, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), resistencia a los antibióticos e infecciones articulares protésicas (IAP). Se revisaron los artículos relevantes basados en las palabras de búsqueda anteriores.

La mayoría de los estudios encontrados fueron estudios en animales, estudios de laboratorio, estudios *in vivo* y algunos estudios clínicos. Debido a limitaciones de tiempo, no se pudo realizar una revisión sistemática completa de la literatura. Un biofilm puede definirse como una comunidad sétil derivada de microbios caracterizada por células que están conectadas a un sustrato, una interfaz o una a otra, englobadas por una matriz de sustancia polimérica extracelular y exhiben un fenotipo alterado con respecto al crecimiento, la expresión génica y la producción de proteínas [1]. El grosor de la película biológica puede variar entre una sola capa de células y una gran comunidad de células englobadas dentro de una matriz polimérica. Recientes análisis estructurales han demostrado que estos biofilms poseen una arquitectura sofisticada en la cual pueden existir microcolonias en pilares discretos o estructuras en forma de hongo [2]. Entre estas estructuras, una red de canales intrincados proporciona acceso a nutrientes ambientales.

La IAP puede iniciarse por diseminación hematogena o por siembra directa a través de una infección suprayacente, trauma penetrante o contaminación durante la implantación quirúrgica de las prótesis. Independientemente de la fuente de siembra o de las especies microbianas, la progresión gradual de la infección depende de la formación y maduración de las biopelículas. El ciclo de vida de la infección por biofilm generalmente sigue los mismos pasos de adhesión (interacción entre las bacterias y el implante), acumulación (interacciones entre las células bacterianas), maduración (formación de una estructura 3D viable) y dispersión/desprendimiento (liberación del biofilm). Esta progresión está mediada por la interacción de una serie de factores microbianos, del huésped y ambientales, y estos suelen ser diferentes en diversas especies microbianas o incluso en cepas dentro de las especies. Se puede observar una progresión rápida cuando se trata de patógenos virulentos que se desarrollan en un huésped susceptible (por ejemplo,

una cepa virulenta de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en un huésped con inmunosupresión). En contraste, un microbio infectante con crecimiento lento y baja virulencia (por ejemplo, *Cutibacterium acnes*, antes llamado *Propionibacterium acnes*) en un huésped sano capaz de suprimir la formación de biofilm puede producir una infección indolente con progresión retardada.

Al adoptar este modo de vida sétil, los microbios incorporados al biofilm disfrutan de varias ventajas sobre sus hermanos en situación planctónica. Una ventaja es la capacidad de la matriz polimérica para capturar y concentrar una serie de nutrientes ambientales, como carbono, nitrógeno y fosfato [3]. Otra ventaja del crecimiento bacteriano dentro del biofilm es que permite la resistencia a varias estrategias de eliminación: agentes antimicrobianos y antiadherentes, cargas mecánicas tangenciales, acción de los fagocitos, radicales de oxígeno y proteasas del huésped. Esta resistencia a los mecanismos antimicrobianos está potenciada porque los microorganismos presentan niveles metabólicos muy bajos y tasas de multiplicación celular drásticamente reducidas, y su máxima expresión son los *Staphylococcus SCV* (variantes de colonias pequeñas) [4]. Si bien las tasas metabólicas bajas pueden explicar gran parte de las propiedades de resistencia a los antimicrobianos de las biopelículas, otros factores también pueden influir. Uno de estos factores puede ser la capacidad de las biopelículas para actuar como una barrera de difusión que frena la penetración de algunos agentes antimicrobianos [5]. Por ejemplo, las especies oxidativas reactivas pueden desactivarse en las capas externas de la biopelícula más rápidamente que en las capas inferiores [6].

La última ventaja del modo de crecimiento del biofilm es el potencial de dispersión al desligarse. Como se mencionó, las microcolonias pueden existir en estructuras discretas, en forma de hongo. Estas microcolonias pueden desprenderse por el efecto de cizallamiento del fluido mecánico o por una respuesta programada genéticamente que media el proceso de desprendimiento [7]. Transportada por el flujo de fluidos, esta microcolonia viaja a otras regiones del huésped para asistir y promover la formación de biofilm en áreas vírgenes. Por lo tanto, el biofilm supone una colonización bacteriana persistente, resistente a los agentes antimicrobianos, resistente al sistema inmune del huésped, que al mismo tiempo facilita la propagación bacteriana a distancia.

Formación de biofilm de *S. aureus*

Si bien muchos patógenos bacterianos son capaces de formar biofilms en una variedad de contextos clínicos, *S. aureus* es el principal agente etiológico asociado con IAP. La fase inicial de la formación de biofilm se caracteriza por la adhesión de bacterias planctónicas a una superficie. En un modo de crecimiento planctónico, *S. aureus* regula en forma ascendente la expresión de mediadores clave para la inmunoinhibición (por ejemplo, la proteína A) y el ajuste a las superficies biológicas. Estos mediadores son una variedad de proteínas ancladas en la pared celular, el grupo más grande de los cuales se denominan componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM) [8]. La unión de MSCRAMM a componentes del hospedador tales como fibronectina, fibrinógeno, colágeno y citoqueratina es un primer paso importante en la adhesión de *S. aureus* para iniciar la formación de biofilm [9]. La adherencia a las superficies abióticas también está determinada por las propiedades y características fisicoquímicas de la superficie abiótica y de la superficie bacteriana, y las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas desempeñan un papel importante [10].

Sin embargo, vale la pena señalar que muchas superficies abióticas, como es el caso de muchos dispositivos médicos implantados, se recubren rápidamente con componentes de la matriz del huésped después de la implantación. Esto ha dado lugar a que todos los intentos de fabricar superficies diseñadas para ser "resistentes al biofilm" han fracasado *in vivo*, puesto que el *S. aureus* no se adhiere a dicho diseño especial, sino a esas superficies una vez recubiertas o acondicionadas por las proteínas del huésped [11]. La presencia de una superficie desvitalizada recubierta con proteínas de la matriz extracelular del huésped disminuye la dosis infecciosa necesaria para causar una infección hasta menos de 100 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de *S. aureus*, lo que aumenta la capacidad de dicha bacteria para causar infecciones mediante biopelículas en más de 75.000 veces [12].

Después de la adhesión inicial, las bacterias proliferan y producen una matriz extracelular (MEC), a menudo denominada limo o glicocalix, compuesta de proteínas (derivadas tanto del huésped como bacterianas), carbohidratos y ADN extracelular (eDNA). Estos sirven como un andamio para la maduración y la estructuración en 3D del biofilm [11]. En última instancia, a través de la degradación coordinada de la MEC mediante proteasas, nucleasas, hemolisina delta y otros factores (por ejemplo, modulinas solubles en fenol), las células bacterianas se liberan de la biopelícula pudiendo potencialmente diseminarse e iniciar focos secundarios de infección a distancia [13]. A continuación, se presenta una breve discusión de los factores y mecanismos responsables de estas etapas del ciclo de vida del biofilm de *S. aureus*.

La siguiente fase de la formación de biopelículas implica la proliferación y acumulación de células bacterianas adheridas. Durante esta fase temprana, la adherencia intercelular desempeña un papel clave en la estabilización del biofilm temprano, antes de que se produzca una cantidad significativa de MEC que proteja a las células unidas de fuerzas perturbadoras, tales como las fuerzas de cizallamiento corte [11]. Un contribuyente clave para la adhesión intercelular es la adhesina intercelular polisacárida (PIA), estudiada por primera vez en *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) [14]. Los MSCRAMM (discutidos anteriormente) y ciertas proteínas citoplásmicas que se han demostrado que se unen al eDNA también contribuyen [15-17]. Actuando todos juntos, estos factores no solo desempeñan un papel en la adhesión intercelular temprana, sino que también constituyen componentes principales de la MEC producida por las del biofilm.

Estudios recientes que utilizan tecnología que permite la evaluación casi en tiempo real de la progresión del biofilm han sugerido la adición de una etapa de desarrollo del biofilm después de la

proliferación/acumulación y que podría denominarse fase de "éxodo" [18]. Esta fase de éxodo se caracteriza por un evento de dispersión temprana con una reducción en la biomasa total de la biopelícula. Según se informa, esto se logra a través de la expresión bacteriana coordinada de las nucleasas secretadas por una subpoblación de células bacterianas que resulta en la degradación del eDNA y la posterior liberación bacteriana [18]. El propósito de esta fase y su necesidad para la progresión general del ciclo de vida del biofilm está aún por determinar. Sin embargo, dado el tiempo de estas observaciones dentro de la progresión general de la formación de biofilm, se ha sugerido que se produce un cambio dinámico en el que los eventos tempranos están medidos principalmente por proteínas y los eventos subsiguientes están mediados tanto por la proteína como por el eDNA [11]. Aunque algunos estudios sugieren que ciertas biopelículas tienden a depender exclusivamente de PIA, proteínas o eDNA, estos estudios proponen un modelo de desarrollo más dinámico con cambios temporales y espaciales en los componentes de la MEC [11].

La fase de maduración del ciclo de vida del biofilm implica la estructuración en 3D de los biofilms en estructuras arquitectónicas clásicas (torres y estructuras tipo seta) y el desarrollo de microcolonias que muestran cierto grado de diversidad fenotípica [10,11]. Esta estructuración compleja se coordina a través del equilibrio de factores adhesivos y disruptivos [10]. Los factores adhesivos incluyen los componentes de MEC discutidos anteriormente, tales como PIA, proteínas y eDNA. Los factores disruptivos incluyen enzimas que degradan estos componentes, tales como proteasas y nucleasas, así como las moléculas similares a surfactantes, las modulinas solubles en fenol (PSM). Estos factores disruptivos permiten la remodelación y maduración de las estructuras de biofilm. Por ejemplo, los estudios han demostrado que los canales se crean a lo largo de una biopelícula a través de la actividad similar a surfactante de los PSM, lo que permite que los nutrientes alcancen capas más profundas del biofilm [19]. Por lo tanto, estos estudios describen la maduración de las biopelículas como un proceso sustractivo. Alternativamente, algunos estudios sugieren un proceso aditivo de maduración a partir de observaciones de microcolonias que surgen de capas basales de biofilms de crecimiento más lento [20]. Es probable que tanto los procesos aditivos como los sustractivos contribuyan a la estructuración compleja observada durante la maduración del biofilm.

El paso final del ciclo de vida del biofilm consiste en la dispersión de las células con la capacidad de viajar a sitios distantes para diseminar la infección. El mecanismo por el cual *S. aureus* regula este paso está mediado en gran medida por el sistema de *quórum* "quorum sensing" regulador del gen accesorio (*agr*) [19, 21]. El sistema *agr* responde a la densidad celular a través de la acumulación de moléculas de señal, lo que permite que se produzca la dispersión una vez que se alcanza una densidad de umbral [22]. Los factores *agr*-regulados que se han propuesto para mediar en la dispersión incluyen proteasas secretadas y la degradación resultante de los componentes proteicos de la MEC [23]. También se ha propuesto que la dispersión esté mediada por la producción de PSM mediada por la *agr*, que actúa interrumpiendo las interacciones moleculares dentro del biofilm [19].

Además de estos factores estafilocócicos responsables del desarrollo de IAP, la naturaleza cómplice del huésped hacia la formación de biofilm también juega un papel importante. Ante una infección temprana por biofilm de *S. aureus*, el huésped se defiende con una respuesta inflamatoria intensa. *S. aureus* es capaz de resistir fácilmente mediante un gran número de factores de virulencia que atacan específicamente al huésped y promueven la inmunoinhibición. La expresión de los factores de virulencia de *S. aureus*, cronometrada por el sistema de *quórum* "quorum sensing", promueve que el huésped libere citoquinas TH₁, incluida la interleucina (IL)-12, el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y la IL-17, todo lo

cual resulta en un cambio del sistema inmune que acaba desarrollando una respuesta inefectiva. Efectivamente, este tipo de respuesta es incapaz de eliminar una infección por biofilm, lo que permite que *S. aureus* desarrolle un biofilm completamente maduro y una infección persistente. La otra rama de la inmunidad adaptativa, la respuesta mediada por el anticuerpo TH2, es eficaz para eliminar la infección en la fase temprana de formación de biofilm antes de que progrese a un fenotipo completamente maduro. Sin embargo, esta respuesta es desactivada por las citoquinas del huésped producidas como respuesta inicial a *S. aureus*, especialmente IFN- γ , y por la producción de superantígenos, cápsulas y otras toxinas de *S. aureus*. Además, *S. aureus* produce una serie de antígenos señuelo altamente inmunogénicos (por ejemplo, lipasa) que aumentan su capacidad para causar enfermedades y reducen la producción de anticuerpos contra antígenos más patogénicos [24]. Más tarde, cuando el sistema inmunitario mediado por anticuerpos se recupera y consigue desarrollar una respuesta efectiva contra la infección por biofilm, ya es tarde, la biopelícula completamente madura es capaz de resistir todo tipo de ataques. Incluso si se elimina mediante resección quirúrgica (extracción de los implantes y desbridamiento agresivo) y esta infección se cura, la manipulación descrita de la respuesta inmune del huésped y la expresión variable del antígeno permiten que *S. aureus* vuelva a infectar a los pacientes durante toda su vida (es decir, un ser humano nunca desarrolla una inmunidad permanente, para toda su vida, frente a los *S. aureus*, como si hace frente a otros microorganismos).

Una vez en esta fase completamente madura, la infección puede permanecer inactiva durante años o incluso décadas, o más típicamente, mostrará signos notables de inflamación crónica [25]. Esta respuesta del huésped a menudo se debe a la metástasis de subpoblaciones planctónicas metabólicamente activas y virulentas que se han dispersado/separado del agregado de biofilm localizado. La terapia con antibióticos es efectiva contra estas poblaciones activas, lo cual permite la supresión temporal de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad subyacente. Sin embargo, tras el cese del tratamiento con antibióticos, se producirá una exacerbación de la enfermedad.

Biofilms formados por otras especies microbianas

Además de *S. aureus*, muchas otras especies microbianas son capaces de formar biofilms infecciosos en IAPs [26]. Estas incluyen anaerobios, grampositivos, bacterias no móviles, incluyendo estafilococos coagulasa negativos y especies de *Streptococcus* y *Enterococcus*. Las etapas de la formación de biofilm son similares, y estos microbios homólogos a los factores de virulencia ya descritos para *S. aureus*. Todas estas especies de microbios pueden producir IAP, en particular los bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, que incluyen *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*; los anaerobios obligados lo hacen en menor medida. Las biopelículas bacterianas gramnegativas, especialmente las de *P. aeruginosa*, han sido estudiadas durante mucho tiempo en el campo de la investigación de las biopelículas debido a su naturaleza ubicua en el medio ambiente y a su preponderancia en las heridas crónicas y en la fibrosis quística. Si bien las etapas progresan a través de la adhesión temprana, la madurez, la acumulación y la dispersión/desprendimiento, los mecanismos por los cuales se realizan estos pasos muestran diferencias importantes con respecto a los patógenos grampositivos. La motilidad proporcionada a través del flagelo permite a *P. aeruginosa* la adhesión inicial a superficies cercanas, como las de los implantes médicos. Las células microbianas procederán entonces a una adhesión irreversible. Además, los pili Tipo IV proporcionan una producción de factor de virulencia diferencial y permiten que las subpoblaciones migren en la superficie a través de la motilidad de contracción. A medida que se acumula la biopelícula, se produce la formación de estructuras multicelulares

complejas que demuestran heterogeneidad de nutrición, pH y oxigenación. Durante la maduración, también se produce el desarrollo de vesículas de membrana, nanofilamentos, soporte estructural eDNA y acoplamiento eléctrico de las células bacterianas englobadas en el biofilm. A medida que la población aumenta, el sistema de *quorum sensing* de la lactona homoserina induce la producción de surfactante y de ramnolípidos pseudomonales anti-leucocitos que impiden la actuación específica anti-pseudomona del sistema inmune pero al mismo tiempo aumentan la respuesta inflamatoria. Luego, los microbios pueden dispersarse como poblaciones planctónicas unicelulares o separarse de la biopelícula en grandes conglomerados flotantes que permiten la metástasis de la infección mientras disfrutan del entorno protector de la matriz del biofilm.

Relevancia clínica: tratamiento

Durante la etapa aguda temprana de la infección y la inflamación, el biofilm está en una fase de acumulación inicial. Durante esta fase, este biofilm creciente muestra una mayor susceptibilidad a la terapia antimicrobiana que el biofilm completamente maduro y metabólicamente inactivo. Este aumento de la susceptibilidad a la terapia antimicrobiana durante la fase aguda de las IAPs se tradujo en un tratamiento eficaz sin intervención quirúrgica [28]. Cuando la terapia antimicrobiana combinada efectiva se usó de modo aislado (sin cirugía adicional) para tratar las IAPs con signos clínicos de menos de un mes de duración, más del 83% de los pacientes fueron curados sin intervención quirúrgica. Sin embargo, cuando los síntomas habían persistido más de seis meses, el éxito de la terapia aislada con antibióticos cayó a poco más del 30%. Por lo tanto, el potencial para la terapia efectiva de las IAPs sin intervención quirúrgica puede ser una posibilidad si la infección se diagnostica temprano y la terapia antibiótica dirigida se inicia rápidamente con énfasis en agregar rifampicina cuando *Staphylococcus spp* es el agente etiológico. Después de esta ventana terapéutica temprana, el desbridamiento quirúrgico adecuado junto con la terapia antibiótica de combinación son necesarios para la resolución óptima de la infección.

Relevancia clínica: diagnóstico

La identificación rápida de las bacterias causantes, así como su sensibilidad a antibióticos, deben realizarse cuanto antes para combatir eficazmente las IAP. Actualmente, la identificación de patógenos requiere un cultivo microbiano seguido de análisis que normalmente requieren rondas adicionales de replicación en el cultivo o purificación de productos bacterianos/fúngicos específicos. En el mejor de los casos, la identificación microbiana puede requerir días o semanas, dependiendo de la tasa de crecimiento de un patógeno específico. Estas limitaciones de los procedimientos diagnósticos actuales se exageran dramáticamente en las IAP. El cultivo de muestras de tejido puede ser efectivo durante las etapas tempranas de la infección cuando el biofilm está en una fase de acumulación y las poblaciones planctónicas están presentes. Sin embargo, con demasiada frecuencia, los pacientes han recibido terapia antimicrobiana antes del muestreo adecuado del tejido, eliminando así las poblaciones planctónicas de fácil detección, dejando solo pequeños agregados microbianos que a menudo se pasan por alto durante la biopsia. Además, a medida que madura la biopelícula, la respuesta inmune del huésped forma una pared alrededor del nido infeccioso, lo cual dificulta más aún la detección. En conclusión, comprender la progresión de los ciclos de vida de las biopelículas y los mecanismos que los patógenos utilizan para regular esta progresión es esencial para el desarrollo de enfoques terapéuticos destinados a prevenir, interrumpir y erradicar las infecciones asociadas con el biofilm.

REFERENCIAS

- [1] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167-193.
- [2] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- [3] Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev.* 1997;20:291-303.
- [4] Brown MR, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol.* 1993;74 Suppl:87S-97S.
- [5] Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology (Reading, Engl).* 2000;146 (Pt 3):547-549. doi:10.1099/00221287-146-3-547.
- [6] De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:4339-4344.
- [7] Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:2355-2359.
- [8] Navarre WW, Schneewind O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1994;14:115-121.
- [9] Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, et al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* 2009;4:1337-1352. doi:10.2217/fmb.09.102.
- [10] Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 2013;64:175-188. doi:10.1146/annurev-med-042711-140023.
- [11] Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol.* 2017;104:365-376. doi:10.1111/mmi.13634.
- [12] Elek SD. Experimental staphylococcal infections in the skin of man. *Ann N Y Acad Sci.* 1956;65:85-90.
- [13] Le KY, Dastgheyb S, Ho TV, Otto M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:167. doi:10.3389/fcimb.2014.00167.
- [14] Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, et al. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 1996;178:175-183.
- [15] Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol Microbiol.* 2016;99:123-134. doi:10.1111/mmi.13219.
- [16] Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:14407-14412. doi:10.1073/pnas.0911032107.
- [17] Mackey-Lawrence NM, Potter DE, Cerca N, Jefferson KK. *Staphylococcus aureus* immunodominant surface antigen B is a cell-surface associated nucleic acid binding protein. *BMC Microbiol.* 2009;9:61. doi:10.1186/1471-2180-9-61.
- [18] Moormeier DE, Bose JL, Horswill AR, Bayles KW. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *MBio.* 2014;5:e01341-0134. doi:10.1128/mBio.01341-14.
- [19] Periasamy S, Joo H-S, Duong AC, Bach T-HL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:1281-1286. doi:10.1073/pnas.115006109.
- [20] Moormeier DE, Endres JL, Mann EE, Sadykov MR, Horswill AR, Rice KC, et al. Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological niches. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:3413-3424. doi:10.1128/AEM.00395-13.
- [21] Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 2003;188:706-718. doi:10.1086/377239.
- [22] Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Rydén C, Tarkowski A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun.* 1993;61:3879-3885.
- [23] Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000052. doi:10.1371/journal.ppat.1000052.
- [24] Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirliff ME. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infect Immun.* 2006;74:3415-3426. doi:10.1128/IAI.00392-06.
- [25] Libraty DH, Patkar C, Torres B. *Staphylococcus aureus* reactivation osteomyelitis after 75 years. *N Engl J Med.* 2012;366:481-482. doi:10.1056/NEJMc111493.
- [26] Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:302-345. doi:10.1128/CMR.00111-13.
- [27] 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.
- [28] Barberán J, Aguilar L, Carroquino G, Giménez M-J, Sánchez B, Martínez D, et al. Conservative treatment of staphylococcal prosthetic joint infections in elderly patients. *Am J Med.* 2006;119:993.e7-10. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.036.



Autores: Philip C Noble, Olga Pidgaiska, Carla Renata Arciola, Zack Coffman, Sara Stephens, Sabir Ismaily, Ryan Blackwell, Davide Campoccia, Lucio Montanaro

PREGUNTA 2: ¿Qué propiedades de la superficie favorecen la formación de biofilm?

RESPUESTA: La adhesión de las bacterias al implante y las superficies biológicas es un proceso complejo, que comienza con el recubrimiento inicial por sustancias adsorbidas del huésped (acondicionamiento de la superficie). La rugosidad, la hidrofobicidad/hidrofilicidad, la porosidad, la topología de los poros y otras condiciones de la superficie son los factores clave para la adhesión microbiana. Debido a la gran variedad de estos factores, la mayoría de los estudios dirigidos al tratamiento bacteriano de la superficie del implante se limitaron a condiciones específicas de la superficie, ya que es difícil examinar la gran cantidad de parámetros concomitantemente. Existen conclusiones variables entre la ciencia básica disponible y los estudios en animales relacionados con este tema, muchos de los cuales se describirán con mayor detalle a continuación. Las bacterias pueden formar biopelículas en casi todas las superficies protésicas y biológicas. Hasta la fecha, este grupo de consenso no conoce ninguna superficie que no permita el crecimiento del biofilm in vivo.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Se sabe que las biopelículas bacterianas contribuyen a la etiología de las infecciones crónicas y las infecciones asociadas a implantes. El desarrollo del biofilm comienza a partir de la formación de una capa de acondicionamiento propicia para la adhesión bacteriana, la propia adhesión y la secreción de una sustancia similar al limo [1]. Es esta secreción la que permite la formación de biofilm, todo lo cual finalmente es culpable de la mayor resistencia a los antibióticos y al sistema inmunitario del huésped. Se han identificado varias propiedades

de la superficie que pueden influir en la formación de biopelículas, entre ellas: química de la superficie y grupos funcionales, energía libre de la superficie y nivel de hidrofobicidad/hidrofilicidad, carga de la superficie, micro y nano-topografía, y porosidad. La composición química de la superficie, la micro-rugosidad y la energía libre de la superficie parecen prevalecer en importancia [2].

Existe una fuerte evidencia de que el ataque inicial de las especies bacterianas a la superficie de un biomaterial está influenciado

por la presencia de proteínas adsorbidas [13]. Wagner *et al.* [1] encontraron que las superficies de titanio preconicionadas mediante la exposición al plasma sanguíneo mejoraron la adhesión bacteriana tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus*. Asimismo, un estudio realizado por Frade *et al.* demostró hallazgos similares con respecto a la adhesión a la superficie de *Candida albicans* (*C. albicans*) y la subsiguiente formación de biofilm en múltiples superficies después del recubrimiento de suero, incluyendo policarbonato, poliestireno, acero inoxidable, Teflón, cloruro de polivinilo e hidroxiapatita [3].

Del mismo modo, también hay pruebas sólidas que apoyan la conclusión de que la adherencia bacteriana y la formación de biofilm aumentan con la rugosidad de la superficie del implante [4,5]. Un estudio realizado por Karygianni *et al.* demostró que *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* se adhirieron más a una superficie de implante más áspera que a una superficie más lisa [5]. Además, Braem *et al.* demostraron que un recubrimiento de superficie porosa era más susceptible a la formación de biofilms que una superficie más suave a base de titanio después de la exposición a *S. aureus* y *S. epidermidis* (*S. epidermidis*) [4].

Un pequeño número de estudios también han examinado el impacto de la hidrofobicidad/hidrofilicidad de los materiales de implantes en la formación posterior de biofilm [2,3,6]. Por ejemplo, un estudio realizado por Koseki *et al.* con *S. epidermidis* mostró una disminución de la formación de biofilm en la aleación de cobalto-cromo-molibdeno (Co-Cr-Mo), que se relacionó con su mayor hidrofobicidad [2]. Sin embargo, otros dos estudios mostraron resultados contrarios. Por ejemplo, se demostró que *C. albicans* tiene menos actividad metabólica sobre el policarbonato y el acero inoxidable (superficies hidrófilas) en relación con Teflon (superficie hidrófoba) [3]. De manera similar, algunos estudios sostienen que la hidrofilicidad solo tiene un impacto mínimo en la formación de biofilm, como lo demuestra el hecho de que la formación de biofilm de *S. epidermidis* no se alteró significativamente por las diferencias en la capacidad de limpieza superficial [6]. Con todo esto, los hallazgos no son concluyentes en general sobre el impacto de la hidrofilia/hidrofobicidad de la superficie del implante en la formación de biofilm.

Finalmente, hay varias propiedades superficiales que reciben recomendaciones moderadas debido a su evidencia de alta calidad pero baja reproducibilidad en los estudios publicados. Lo primero es que nanoestructuras de la superficie, como las proyecciones y los rebajes, reducen la adhesión bacteriana general y la formación de biofilm en comparación con las superficies lisas [7]. El segundo es

que la baja estabilidad de la nanoestructura inhibe la acumulación de biofilm, probablemente debido a la susceptibilidad de estas nanoestructuras a las fuerzas de cizallamiento [8]. El tercero es que los recubrimientos de óxido de calcio incorporados sobre una superficie de titanio reducen la colonización bacteriana en comparación con el titanio no modificado con calcio. Esto se debe a que el calcio disminuye drásticamente el ángulo de contacto [4].

Aunque hay poco consenso en cuanto a qué propiedades de la superficie son más definitivas para contribuir a la formación de biofilm, ciertamente hay avances en el examen del impacto general de diferentes propiedades cuando se consideran individualmente. Debido a la complejidad de las propiedades de los biomateriales que se utilizan en la fabricación de los implantes ortopédicos, y a la falta de acuerdo en la literatura, concluimos que la formación de biofilm se ve favorecida por combinaciones de parámetros de superficie, por lo que deben evaluarse en su totalidad cuando se pretenda el desarrollo de implantes biofilm-resistentes. Además, hay pocos estudios que examinen el impacto de las propiedades de la superficie en la formación de biofilm en sujetos humanos después de la operación, y por ello se requieren estudios clínicos adicionales.

REFERENCIAS

- [1] Wagner C, Aytac S, Hänsch GM. Biofilm growth on implants: bacteria prefer plasma coats. *Int J Artif Organs*. 2011;34:811–817. doi:10.5301/ijao.5000061.
- [2] Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y, et al. Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. *PLoS ONE*. 2014;9:e107588. doi:10.1371/journal.pone.0107588.
- [3] Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses*. 2011;54:e154-162. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01862.x.
- [4] Braem A, Van Mellaert L, Mattheys T, Hofmans D, De Waelheyns E, Geris L, et al. Staphylococcal biofilm growth on smooth and porous titanium coatings for biomedical applications. *J Biomed Mater Res. A* 2014;102:215–224. doi:10.1002/jbm.a.34688.
- [5] Karygianni L, Jähnig A, Schienle S, Bernsmann F, Adolfsen E, Kohal RJ, et al. Initial bacterial adhesion on different yttria-stabilized tetragonal zirconia implant surfaces in vitro. *Materials (Basel)*. 2013;6:5659–5674. doi:10.3390/ma6125659.
- [6] Subbiahdoss G, Grijpma DW, van der Mei HC, Busscher HJ, Kuijper R. Microbial biofilm growth versus tissue integration on biomaterials with different wettabilities and a polymer-brush coating. *J Biomed Mater Res. A* 2010;94:533–538. doi:10.1002/jbm.a.32731.
- [7] Perera-Costa D, Bruque JM, González-Martín ML, Gómez-García AC, Vadiello-Rodríguez V. Studying the influence of surface topography on bacterial adhesion using spatially organized microtopographic surface patterns. *Langmuir*. 2014;30:4633–4641. doi:10.1021/la501057.
- [8] Epstein AK, Hochbaum AI, Kim P, Aizenberg J. Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry. *Nanotechnology*. 2011;22:494007. doi:10.1088/0957-4484/22/49/494007.



Autores: Edward Schwarz, Jamie Esteban, Hamidreza Yazdi, John-Jairo Aguilera-Correa

PREGUNTA 3: ¿Es el biofilm en las superficies de implantes ortopédicos permeable a los neutrófilos y macrófagos *in vivo*? ¿Son estas células inmunes innatas (es decir, macrófagos o neutrófilos) capaces de fagocitar y matar bacterias?

RESPUESTA: Una biopelícula bacteriana madura tiene una permeabilidad limitada a los neutrófilos y macrófagos. Aquellos que lo logran son clínicamente ineficaces para erradicar las bacterias. Si bien los neutrófilos y los macrófagos son capaces de fagocitar y matar las bacterias planctónicas, no son capaces de fagocitar y matar bacterias sésiles incluidas en un biofilm.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

El mecanismo patógeno más importante involucrado en las infecciones relacionadas con el implante es la capacidad de los microorganismos para formar una biopelícula [1], que conduce a la protección frente a las agresiones ambientales, la defensa inmune del huésped y los antimicrobianos [2]. Las primeras células que llegan al sitio de la infección son los neutrófilos y los macrófagos [3]. La permeabilidad y la capacidad de fagocitosis de estas células inmunitarias se han evaluado principalmente en dos tipos de infección: la fibrosis quística [4-8] y la infección relacionada con dispositivos médicos, principalmente la infección de catéteres [9-17] y la infección periprotésica [18]. Los neutrófilos son células inmunes innatas capaces de secretar un arsenal de especies oxígeno-tóxicas, enzimas degradantes, defensinas y mediadores inflamatorios de los lípidos para combatir la infección [6]. Estas células han demostrado la capacidad de adherirse, pero no penetrar en un biofilm maduro y fagocitar microorganismos recubiertos con biofilm [4-8,10,11,14,19-23]. Las sustancias exopoliméricas de la matriz del biofilm parecen estar involucradas en la formación de trampas extracelulares para los neutrófilos en la biopelícula de *Streptococcus suis* [21], *Candida albicans* [10] y *Candida glabrata* [11]. Los datos muestran que los neutrófilos pueden destruir una biopelícula de *S. aureus* entre el segundo y el sexto días, pero una biopelícula madura es capaz de resistir la penetración de estas células [24].

Guenther *et al.* estudió el comportamiento diferente de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) hacia el biofilm formado por *S. aureus* o *S. epidermidis*. En el caso de la biopelícula formada por *S. aureus*, se observó que los PMN se movían a través de ella y eliminaban las bacterias a lo largo de su camino. A la inversa, los PMN en contacto con la biopelícula de *S. epidermidis* fueron casi inmóviles y solo fagocitaron bacterias en estrecha proximidad. No se comprende bien la razón por la que las biopelículas de *S. aureus* parecen más sensibles a un ataque de PMN que las producidas por *S. epidermidis* [19]. Los estudios *in vitro* e *in vivo* de Kristian *et al.* han ofrecido información sobre el comportamiento de la biopelícula formada por *S. epidermidis*. Estos autores encontraron que las biopelículas de *S. epidermidis* desencadenaron niveles más altos de activación del complemento en términos de formación de C3a que las bacterias planctónicas de tipo salvaje y las bacterias lisogénicas ica-negativas. Por otro lado, se observó una disminución de la deposición de inmunoglobulina G (IgG) y C3b en bacterias integradas en bio-enlaces. Esto podría explicar la evasión de los PMN [25].

Alhede *et al.* evaluaron el papel del sistema inmunológico contra la biopelícula formada por *P. aeruginosa*. Demostraron que tanto *in vitro* como *in vivo* *P. aeruginosa* dichos biofilms producen un

escudo de ramnolípidos excretados que ofrece protección contra la actividad bactericida de los PMN [26]. Arciola *et al.* realizaron un extenso estudio de biofilm formado por estafilococos en una superficie de implante. Sobre la base de su trabajo, se encontró que los PMN rodeaban el biofilm y se activaban, pero los PMN no pudieron migrar dentro del biofilm, probablemente debido a la falta de una señal quimiotáctica, así como por el obstáculo que el material "viscoso" supone para dicha emigración. Por lo tanto, la incapacidad de los PMN para penetrar en el biofilm produce una progresión de las infecciones relacionadas con el implante. Adicionalmente, la activación de los PMN y su intento de matar bacterias da como resultado la secreción de numerosas enzimas citotóxicas y proteolíticas que no pueden actuar contra las bacterias, y secundariamente se dedican a dañar y destruir tejidos adyacentes del huésped [27].

En las fases agudas de cualquier infección, los macrófagos pasan a ser las células predominantes y permanecen en el sitio de la infección manteniendo una alta concentración durante varias semanas. Están relacionados con el reconocimiento de elementos extraños, la fagocitosis, la secreción de enzimas, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, todo ello con el fin de destruir y digerir los patógenos fagocitados [3]. Estas células pueden penetrar en algunas biopelículas maduras de manera similar a los neutrófilos, y fagocitar microorganismos recubiertos de biopelícula, pero sin destruirlos [9,12,13,18], permaneciendo en el interior de los macrófagos como bacterias intracelulares, en el interior de los llamados nichos de supervivencia intracelular. Además, estas bacterias fagocitadas sésiles pueden incluso persistir en el tejido periimplante dentro de las células macrofágicas no solo en modelos experimentales, sino también en los tejidos de pacientes con catéteres intravenosos colonizados por diferentes bacterias [16,17].

El modelo *in vivo* de la infección protésica por biofilm de *S. aureus* mostró que existe una captación limitada de macrófagos [13], una transformación de macrófagos M1, una alta actividad antimicrobiana del tipo M2 (que de modo inherente posee menos actividad antimicrobiana [13]), e inducción de muerte celular a través de la leucocidina A/B [28] y la producción de antígenos leucocitarios humanos [18]. En este lugar de biofilm estafilocócico los macrófagos exhiben: regulación negativa de la interleucina (IL) -1 β , factor de necrosis tumoral, expresión de CXCL2 y CCL2, reducción de la captación bacteriana, mínima expresión de iNOS y, por consiguiente, baja eficiencia para matar las bacterias fagocitadas y reducir la producción de linfocitos de interferón-. Por tanto, estas células macrofágicas parecen capaces de migrar al biofilm, pero no pueden eliminar al patógeno, ya que su actividad bactericida parece estar muy comprometida [27].

REFERENCIAS

- [1] Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:302-345. doi:10.1128/CMR.0011-13.
- [2] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- [3] da Silva Domingues JF, van der Mei HC, Busscher HJ, van Kooten TG. Phagocytosis of bacteria adhering to a biomaterial surface in a surface thermodynamic perspective. *PLoS ONE.* 2013;8:e70046. doi:10.1371/journal.pone.0070046.
- [4] Häscher GM, Brenner-Weiss G, Prior B, Wagner C, Obst U. The extracellular polymer substance of *Pseudomonas aeruginosa*: too slippery for neutrophils to migrate on? *Int J Artif Organs.* 2008;31:796-803.
- [5] Häscher GM, Prior B, Brenner-Weiss G, Obst U, Overhage J. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014;12:21-26. doi:10.5301/jabfm.5000204.
- [6] Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol.* 2003;171:4329-4339.
- [7] Parks QM, Young RL, Poch KR, Malcolm KC, Vasil ML, Nick JA. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human F-actin and DNA as targets for therapy. *J Med Microbiol.* 2009;58:492-502. doi:10.1099/jmm.0.005728-0.
- [8] Takeoka K, Ichimiya T, Yamasaki T, Nasu M. The in vitro effect of macrolides on the interaction of human polymorphonuclear leukocytes with *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm. *Chemotherapy* 1998;44:190-197. doi:10.1159/000007114.
- [9] Hanke ML, Heim CE, Angle A, Sanderson SD, Kielian T. Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infections. *J Immunol.* 2013;190:2159-2168. doi:10.4049/jimmunol.1202348.
- [10] Johnson CJ, Cabezas-Olcoz J, Kernien JF, Wang SX, Beebe DJ, Huttenlocher A, et al. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005884. doi:10.1371/journal.ppat.1005884.
- [11] Johnson CJ, Kernien JF, Hoyer AR, Nett JE. Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Sci Rep.* 2017;7:13065. doi:10.1038/s41598-017-13588-6.
- [12] Spiliopoulou AI, Krevvata MI, Kolonitsiou F, Harris LG, Wilkinson TS, Davies AP, et al. An extracellular *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide: relation to polysaccharide intercellular adhesin and its implication in phagocytosis. *BMC Microbiol.* 2012;12:76. doi:10.1186/1471-2180-12-76.
- [13] Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol.* 2011;186:6585-6596. doi:10.4049/jimmunol.1002794.
- [14] Boelens JJ, Dankert J, Murk JL, Weening JJ, van der Poll T, Dingemans KP, et al. Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J Infect Dis.* 2000;181:1337-1349. doi:10.1086/315369.
- [15] Broekhuizen CAN, de Boer L, Schipper K, Jones CD, Quadir S, Feldman RG, et al. Peri-implant tissue is an important niche for *Staphylococcus epidermidis* in experimental biomaterial-associated infection in mice. *Infect Immun.* 2007;75:1129-1136. doi:10.1128/IAI.01262-06.
- [16] Broekhuizen CAN, Schultz MJ, van der Wal AC, Boszhard L, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Tissue around catheters is a niche for bacteria associated with medical device infection. *Crit Care Med.* 2008;36:2395-2402. doi:10.1097/CCM.0b013e3181818268.
- [17] Broekhuizen C a. N, Sta M, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat S a. J. Microscopic detection of viable *Staphylococcus epidermidis* in peri-implant tissue in experimental biomaterial-associated infection, identified by bromodeoxyuridine incorporation. *Infect Immun.* 2010;78:954-962. doi:10.1128/IAI.00849-09.
- [18] Scherr TD, Hanke ML, Huang O, James DBA, Horswill AR, Bayles KW, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin. *MBio.* 2015;6. doi:10.1128/mBio.01021-15.
- [19] Guenther F, Stroth P, Wagner C, Obst U, Häscher GM. Phagocytosis of staphylococci biofilms by polymorphonuclear neutrophils: *S. aureus* and *S. epidermidis* differ with regard to their susceptibility towards the host defense. *Int J Artif Organs.* 2009;32:565-573.
- [20] Leid JG, Shirliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 2002;70:6339-6345.
- [21] Ma F, Yi L, Yu N, Wang G, Ma Z, Lin H, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 biofilms inhibit the formation of neutrophil extracellular traps. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:86. doi:10.3389/fcimb.2017.00086.
- [22] Maurer S, Fouchard P, Meyle E, Prior B, Häscher GM, Dapunt U. Activation of neutrophils by the extracellular polymeric substance of *S. epidermidis* biofilms is mediated by the bacterial heat shock protein GroEL. *J Biotechnol Biomater.* 2015;5:176-183.
- [23] Zimmerli W, Lew PD, Cohen HJ, Waldvogel FA. Comparative superoxide-generating system of granulocytes from blood and peritoneal exudates. *Infect Immun.* 1984;46:625-630.
- [24] Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J Oral Microbiol.* 2014;6:26102.
- [25] Kristian SA, Birkenstock TA, Sauder U, Mack D, Götz F, Landmann R. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis.* 2008;197:1028-1035. doi:10.1086/528992.
- [26] Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol.* 2014;86:1-40. doi:10.1016/B978-0-12-800262-9.00001-9.
- [27] Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials.* 2012;33:5967-5982. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.
- [28] Melehan JH, James DBA, DuMont AL, Torres VJ, Duncan JA. *Staphylococcus aureus* Leukocidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when extracellular, but not intracellular. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004970. doi:10.1371/journal.ppat.1004970.



Autores: Claus Moser, Kardo Saeed

PREGUNTA 4: ¿La escala de tiempo de la formación de biofilm difiere entre las especies bacterianas? Si es así, ¿cuál es la escala de tiempo para los organismos causales comunes?

RESPUESTA: Actualmente, no hay investigación clínica disponible para responder si la escala de tiempo de la formación de biofilm difiere entre las especies bacterianas. Los estudios in vitro muestran una alta variabilidad en la formación de biofilm basada en cepas y condiciones bacterianas. Los estudios en animales han demostrado una rápida formación de biofilm (de minutos a horas). El grupo observa que la línea de tiempo de la formación de biofilm puede no correlacionarse con el inicio de los síntomas de infección.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Las biopelículas se componen de especies únicas o múltiples de agregados microbianos incorporados en una matriz de producción propia de sustancias poliméricas extracelulares. Independientemente de las especies bacterianas, la formación de biofilm se desarrolla en pasos conocidos y bien definidos. El primer paso

o etapa, la adhesión, comienza cuando las bacterias detectan y se adhieren a la superficie de un material. La segunda etapa es la acumulación, donde las bacterias se agregan para formar una biopelícula madura. La última etapa es la dispersión o desprendimiento [1].

La duración de cada uno de estos pasos en la formación de biofilm varía de nanosegundos a horas o semanas, dependiendo de diversos factores como el tamaño del inóculo, el mecanismo de colonización (inoculación perioperatoria directa, posterior colonización directa debida a la ruptura de la barrera, propagación bacteriémica), propiedades superficiales del material extraño, cepa bacteriana y virulencia, especies bacterianas, inmunidad del huésped, uso previo de antibióticos y factores ambientales, etc. [2-10]. Por ejemplo, *P. aeruginosa* contiene varios genes que se activan a los 15 minutos de su adhesión a una superficie que puede ser un punto de partida para la formación de biofilm [3]. Kanno *et al.* desarrollaron heridas de espesor completo en la espalda de las ratas y las inocularon con *P. aeruginosa* que llevaba el gen de la proteína fluorescente verde; encontraron que las biopelículas podrían desarrollarse en ocho horas [4]. Cuando se inoculó *S. aureus* en heridas de animales, los investigadores encontraron el desarrollo de grupos de células (características de una biopelícula) después de 6-24 horas después de la inoculación [11,12]. Oliveria *et al.* evaluaron la evolución en el tiempo del biofilm en aislamientos de mastitis y no encontraron diferencias significativas entre *S. aureus* y *S. epidermidis*. En su estudio, la capacidad de formación de biopelículas aumentó con el período de incubación para ambas especies [5].

Hoffman *et al.* investigaron patrones de adhesión de una sola bacteria *Caulobacter crescentus* sobre una superficie de vidrio en un dispositivo microfluídico. Mostraron la importancia de los pili para acelerar la adhesión bacteriana. En su estudio, los eventos de adhesión irreversible fueron más frecuentes en las células de tipo salvaje (3,3 eventos/min) en comparación con las células mutantes sin pili (0,2 eventos/min) [13]. Koseki *et al.* [6] evaluaron la diferencia en la formación temprana de biofilm por la acción polisacárido adhesina intercelular (PIA) *S. epidermidis* positivo en cinco tipos de biomateriales y no encontraron diferencias significativas en la tasa de cobertura de biofilm en una incubación de dos a cuatro horas, pero seis horas después de la incubación la aleación de cobalto-cromo-molibdeno (Co-Cr-Mo) tuvo una tasa de cobertura de biofilm significativamente más baja que otros materiales como la aleación de titanio (Ti-6Al-4V), titanio comercialmente puro y acero inoxidable. En este estudio, los autores señalan un grado similar de suavidad entre los materiales como una razón para que no haya una diferencia significativa entre ellos inicialmente (de dos a cuatro horas). En este estudio, la rugosidad promedio (Ra) fue inferior a 10 nm [6]. Esto es corroborado por los informes anteriores de que la adhesión bacteriana está limitada por el umbral de rugosidad de la superficie a valores superiores a 200 nm [14,15].

Algunas pruebas sugieren que las sustancias bioactivas como la hidroxiapatita pueden ser más propensas a la adhesión bacteriana que los metales bioinertes, como las aleaciones de titanio y el acero inoxidable [7]. Otros estudios han demostrado que el polimetilmetacrilato (PMMA) es capaz de albergar biopelículas que pueden causar infecciones agudas, crónicas y de inicio tardío [8,9].

La adherencia de la biopelícula a materiales biológicos o sintéticos, células extrañas y la resistencia a los antimicrobianos no se conocen bien. Como la formación de biofilm puede avanzar a través de diferentes vías y rangos de tiempo, su detección puede variar de acuerdo con el tiempo de observación. Los modelos de investigación para determinar cómo los factores ambientales, como la geometría de la superficie, las características físicas y químicas y el flujo sanguíneo local y el sistema inmunológico afectan el desarrollo de las biopelículas en las prótesis articulares son esenciales para comprender mejor las varias biopelículas bacterianas y proporcionar una perspectiva de las estrategias terapéuticas.

REFERENCIAS

- [1] Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 2014;22:517-527. doi:10.1016/j.tim.2014.05.002.
- [2] Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 2002;417:552-555. doi:10.1038/417552a.
- [3] Costerton JW, Stewart PS. Battling biofilms. *Sci Am.* 2001;285:74-81.
- [4] Kanno E, Toriyabe S, Zhang L, Imai Y, Tachi M. Biofilm formation on rat skin wounds by *Pseudomonas aeruginosa* carrying the green fluorescent protein gene. *Exp Dermatol.* 2010;19:154-156. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00931.x.
- [5] Oliveira M, Nunes SF, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela CL. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 2007;124:187-191. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.016.
- [6] Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y, et al. Early *Staphylococcal* Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: In vitro Study. *PLoS ONE.* 2014;9:e107588. doi:10.1371/journal.pone.0107588.
- [7] Oga M, Arizono T, Sugioka Y. Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied in vitro. *Acta Orthop Scand.* 1993;64:273-276. doi:10.3109/17453679308993623.
- [8] Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury.* 2006;37:559-66. doi:10.1016/j.injury.2006.04.010.
- [9] Neut D, van de Belt H, Stokroos I, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:885-891. doi:10.1093/jac/47.6.885.
- [10] Arnold W V, Shirtliff ME, Stoodley P. Bacterial biofilms and periprosthetic infections. *Instr Course Lect.* 2014;63:385-391.
- [11] 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;11:234-238. doi:10.1016/0923-1811(95)00448-3.
- [12] Gurjala AN, Geringer MR, Seth AK, Hong SJ, Smeltzer MS, Galiano RD, et al. Development of a novel, highly quantitative in vivo model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2011;19:400-410. doi:10.1111/j.1524-475X.2011.00690.x.
- [13] Hoffman MD, Zucker LI, Brown PJB, Kysela DT, Brun Y V., Jacobson SC. Timescales and frequencies of reversible and irreversible adhesion events of single bacterial cells. *Anal Chem.* 2015;87:12032-12039. doi:10.1021/acs.analchem.5b02087.
- [14] Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995;22:1-14.
- [15] Busscher HJ, Uyen MH, van Pelt AW, Weerkamp AH, Arends J. Kinetics of adhesion of the oral bacterium *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51:910-914.



Autores: Dustin Williams, Kenneth Uris

PREGUNTA 5: ¿Las bacterias forman biopelículas en la superficie del espaciador de cemento de manera similar a un implante metálico?

RESPUESTA: Sí. Si bien la gran mayoría de los estudios han sido *in vitro*, existe evidencia clínica de que la mayoría de las bacterias pueden formar biofilm en la superficie del espaciador de cemento.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

La mayoría de los datos que evalúan el crecimiento de biofilm en materiales poliméricos y superficies lisas se han recopilado de experimentos *in vitro* [1]. Como esquema general, la adherencia microbiana a los materiales se produce en el siguiente orden: látex > silicona > PVC > Teflón > poliuretano > acero inoxidable > titanio [1,2]. Esta jerarquía de materiales con respecto a la adherencia bacteriana sugiere que las biopelículas pueden desarrollarse más fácilmente en superficies de materiales a base de polímeros frente a materiales metálicos. La aspereza puede jugar un papel en esto [3]. Sin embargo, el tiempo también es un factor importante a considerar.

Verran *et al.* mostró que *Candida albicans* se adhirió en mayor grado a las superficies rugosas en comparación con las lisas [4]. En su experimento, las muestras de polímeros se incubaron durante una hora y luego se evaluaron para determinar los perfiles de adhesión. Un trabajo similar fue realizado por Taylor *et al.* en materiales de cromo cobalto con la misma conclusión [5]. Si bien un período de incubación de una hora puede ser beneficioso para determinar los perfiles de adherencia iniciales, sería difícil comparar los criterios de la prueba, como estos, con los escenarios clínicos en los que los materiales implantados están presentes durante días, semanas, meses o años. Wolcott *et al.* han demostrado que el tiempo puede desempeñar un papel importante en la maduración del biofilm y la tolerancia a los antibióticos [6].

Las biopelículas son bien conocidas para acondicionar superficies y hacerlas propicias para sus requisitos de crecimiento [3]. Quizás uno de los ejemplos más conocidos de esto sea *Streptococcus mutans*, que condiciona la superficie del esmalte dental, lo cual permite la adherencia de cientos de otras especies bacterianas [7]. Con suficiente tiempo, las biopelículas pueden florecer en superficies en muchos entornos y en superficies que de otra manera podrían considerarse menos cultivables [3,8,9]. Los experimentos internos que están en proceso de publicación han demostrado que incluso entre las mismas especies, diferentes cepas pueden diferir en las tasas de formación de biofilm en las superficies de titanio, pero con el tiempo, el grado de formación de biofilm es similar en condiciones más propicias.

Los principios y el problema de la formación de biofilm se aplican al cemento óseo y a las superficies metálicas utilizadas en aplicaciones ortopédicas. Se ha demostrado que las biopelículas se desarrollan en ambos tipos de materiales y afectan adversamente los resultados clínicos [10-13]. Un artículo seminal publicado por Gristina *et al.* proporcionó una de las primeras indicaciones de crecimiento de biofilm en un implante metálico implantado que contribuyó a la infección relacionada con biofilm [14]. Más recientemente, Stoodley *et al.* observó directamente biofilm en el cemento óseo con antibióticos asociados con una artroplastia total de codo infectada [12]. McConoughey *et al.* también han identificado biofilm bacteriano en componentes implantados [15]. Shaw *et al.* observó biofilm, a través

de la tinción con azul de metileno, que se había desarrollado en una bandeja tibial y otros componentes de la articulación durante la cirugía de revisión [16]. En múltiples casos, se ha observado biofilm directamente en muestras clínicas. Debido a la naturaleza heterogénea y, a veces difícil obtención de muestras clínicas, se han encontrados resultados limitados, que confirman el crecimiento de la biopelícula en materiales metálicos y de cemento, a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Minelli *et al.* mostraron la capacidad de múltiples cepas bacterianas estafilocócicas para formar biofilm en muestras de cemento óseo en todos los casos [17]. Neut *et al.* observaron que la *P. aeruginosa* productora de limo puede formar fácilmente una biopelícula sobre el cemento, y una vez incluida en ese biofilm puede ser más tolerante a los antibióticos cargados en el cemento que las bacterias planctónicas [18]. Ensing *et al.* evaluaron el crecimiento de las biopelículas en el cemento y el potencial del ultrasonido para eliminar su presencia [19]. Más recientemente, en un estudio realizado por Ma *et al.*, se demostró que los espaciadores de polimetilmetacrilato que se extrajeron en el momento de la reimplantación después de un tratamiento en 2 tiempos para una artroplastia total de rodilla infectada tenían altos niveles de ADN bacteriano a pesar de la exposición prolongada a los antibióticos [20]. La formación de biofilm en superficies metálicas también está bien documentada [21-24]. Nishitani *et al.* también han observado el crecimiento de biofilms en implantes metálicos en ratones [25]. Williams *et al.* han demostrado que a lo largo de varios días de crecimiento en un CDC *Biofilm Reactor*, los biofilms polimicrobianos de *S. aureus* y *Bacillus subtilis* resistentes a meticilina crecen de manera similar en superficies de titanio lisas o rugosas [26].

En resumen, la demostración de que se forma biofilm sobre el cemento óseo y sobre las superficies metálicas de forma similar está presente en muestras clínicas, así como en estudios *in vitro* e *in vivo* en animales. Hay indicios de que las células bacterianas pueden adherirse y formar biopelículas más rápidamente en materiales rugosos/porosos, pero con el tiempo, las bacterias pueden condicionar las superficies de los materiales que son más lisas en la naturaleza, como el metal, y permitir que se forme la biopelícula en un grado similar.

REFERENCIAS

- [1] Schinabeck M, Ghannoum M. Pathogenesis of IMD related infections. In: Pace JL, Rupp ME, Finch RG, editors. Biofilms, infection, and Antimicrobial Therapy, CRC Taylor & Francis; 2006, p. 42-45.
- [2] Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. Clin Infect Dis. 2001;33:1567-1572. doi:10.1086/323130.
- [3] van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. Acta Orthop Scand. 2001;72:557-571. doi:10.1080/000164701317268978.
- [4] Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. J Prosthet Dent. 1997;77:535-539.

- [5] Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent.* 1998;80:592-597.
- [6] Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q, et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care.* 2010;19:320-328. doi:10.12968/jowc.2010.19.8.77709.
- [7] Gibbons RJ, Houtte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev Microbiol.* 1975;29:19-44. doi:10.1146/annurev.mi.29.100175.000315.
- [8] Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science.* 2008;18:1049-1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- [9] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis.* 2002;8:881-890. doi:10.3201/eido809.020063.
- [10] Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop.* 2015;86:147-158. doi:10.3109/17453674.2014.966290.
- [11] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004;350:1422-1429. doi:10.1056/NEJMra035415.
- [12] Stoodley P, Ehrlich GD, Sedghizadeh PP, Hall-Stoodley L, Baratz ME, Altman DT, et al. Orthopaedic biofilm infections. *Curr Orthop Pract.* 2011;22:558-563. doi:10.1097/BCO.0b013e318230e0ef.
- [13] Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;7-11.
- [14] Gristina AG, Costerton JW. Bacteria-Laden Biofilms: A Hazard to Orthopaedic Prosthesis. *Infect Surg.* 1984;3:655-662.
- [15] McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manning MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol.* 2014;9:987-1007. doi:10.2217/fmb.14.64.
- [16] Shaw JD, Miller S, Plourde A, Shaw DL, Wustrack R, Hansen EN. Methylene blue-guided debridement as an intraoperative adjunct for the surgical treatment of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty.* 2017;32:3718-3723. doi:10.1016/j.arth.2017.07.019.
- [17] Bertazzoni Minelli E, Della Bora T, Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe.* 2011;17:380-383. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.013.
- [18] Neut D, Hendriks JGE, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and slime excretion on antibiotic-loaded bone cement. *Acta Orthop.* 2005;76:109-114. doi:10.1080/00016470510030427.
- [19] Ensing GT, Neut D, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. The combination of ultrasound with antibiotics released from bone cement decreases the viability of planktonic and biofilm bacteria: an in vitro study with clinical strains. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1287-1290. doi:10.1093/jac/dkl402.
- [20] Ma D, Shanks RMQ, Davis CM, Craft DW, Wood TK, Hamlin BR, et al. Viable bacteria persist on antibiotic spacers following two-stage revision for periprosthetic joint infection. *J Orthop Res.* 2018;36:452-458. doi:10.1002/jor.23611.
- [21] Darouiche RO, Mansouri MD. Dalbavancin compared with vancomycin for prevention of *Staphylococcus aureus* colonization of devices in vivo. *J Infect.* 2005;50:206-209. doi:10.1016/j.jinf.2004.05.006.
- [22] Darouiche RO, Mansouri MD, Zakarevicz D, Alsharif A, Landon GC. In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:792-797. doi:10.2106/JBJS.F.00414.
- [23] Donlan RM. Biofilms associated with medical devices and implants. In: Jass J, Surman S, Walker J, editors. *Medical Biofilms: Detection, Prevention, and Control*, Wiley;2003, p. 29-96.
- [24] Bernthal NM, Stavrakis AI, Billi F, Cho JS, Kremen TJ, Simon SI, et al. A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate in vivo the efficacy of antimicrobial implant coatings. *PLoS ONE.* 2010;5:e12580. doi:10.1371/journal.pone.0012580.
- [25] Nishitani K, Sutipornpalangkul W, de Mesy Bentley KL, Varrone JJ, Bello-Irizarry SN, Ito H, et al. Quantifying the natural history of biofilm formation in vivo during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J Orthop Res.* 2015;33:1311-1319. doi:10.1002/jor.22907.
- [26] Williams DL, Taylor NB, Epperson RT, Rothberg DL. Flash autoclave settings may influence eradication but not presence of well-established biofilms on orthopaedic implant material. *J Orthop Res.* 2018;36:1543-1550. doi:10.1002/jor.23764.



Autores: Parham Sendi, Giorgio Burastero, Georgios Komnos

PREGUNTA 6: ¿*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) forma una biopelícula sobre los implantes?

RESPUESTA Pocos datos de estudios experimentales in vitro e in vivo y un número limitado de informes de casos indican que *M. tuberculosis* tiene una capacidad lenta, aunque significativa, para formar biofilm en superficies metálicas. El grupo sugiere que el tratamiento de las infecciones relacionadas con el implante de *M. tuberculosis* debe tratarse utilizando los mismos principios que el de otras infecciones relacionadas con el implante.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Métodos

Se realizó una búsqueda en la literatura en idioma inglés sobre la pregunta publicada durante el período de 1966 a 20 de mayo de 2018. La estrategia de búsqueda en PubMed utilizó los términos *M. tuberculosis* y biofilm e identificó 177 artículos. Todos los artículos fueron revisados para la respuesta a la pregunta. La gran mayoría de los artículos se clasificaron como artículos de ciencias básicas que se centran en los componentes para la formación de biopelículas tuberculares in vitro. Una revisión sistemática para responder a la pregunta proporcionada no es significativa. Por lo tanto, la respuesta de la pregunta se responde como un resumen de una revisión narrativa.

Revisión y discusión narrativa de la literatura

Es importante diferenciar entre *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas. Esta revisión se centra sólo en *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis forma biofilms

En el laboratorio, *M. tuberculosis* muestra un crecimiento agregado peculiar, o en otras palabras, puede formar estructuras similares a una película organizada [1]. El sello distintivo de las biopelículas es la autoproducción de la sustancia polimérica extracelular que mantiene unida a la comunidad micobacteriana y confiere heterogeneidad fenotípica a las células genotípicamente idénticas [2]. Varios estudios han destacado los componentes extracelulares dentro de la agregación de *M. tuberculosis*, incluidos los ácidos micólicos [3], los azúcares complejos [4], la celulosa, las proteínas, los lípidos y el ADN [5,6].

Además, las *M. tuberculosis* que residen dentro de estructuras similares a una película organizada muestran tolerancia a los fármacos frente a los agentes antituberculosos [3]. De este modo, se dan los criterios de estructura a lo que se interpreta como biofilm.

TABLA 1. Revisión de la literatura: IAP por *Mycobacterium tuberculosis* tratada con antibiostatísticos sin cirugía

Autor/año	Articulación	Edad/sexo	Factores de riesgo reportados o historia clínica previa	Dx preprotésico	Tratamiento desde...		Infecciones concomitantes	Exámenes instrumentales	Análisis histológicos	Dx microbiológicos	Otros sitios	Terapia médica (duración en meses)	Cirugía	Tratamiento desde la terapia médica hasta la cirugía	Seguimiento promedio desde el final de la terapia
					desde artropatía hasta la infección	desde infección hasta diagnóstico o terapia									
Wray; 1987	Rodilla	63/M	Ninguno	Osteoartritis	Postoperatorio	NR	NR	RX	IGC	NR	Pulmón	INH, RIF (12)	No	NR	18 meses
Present work, case 2	Rodilla	62/M	Ninguno	Osteoartritis	Postoperatorio	NR	NR	RX, Gammagrafía	IGC	Cultivo de ArC	Ninguno	NH, RIF (18), PZA (2)	No	NR	1 mes
Tekin Koruk; 2013	Rodilla	55/M	Ninguno	Osteoartritis	15 días	NR	NR	RX	IGC	Microscopia y cultivo de ArC	Ninguno	INH, RIF (12), PZA, EMB (2)	No	NR	NR
Kadakia; 2007	Rodilla	85/F	Ninguno	Fractura traumática	1 mes	SCN	NR	RX	NR	Cultivo de ArC	Pulmón	INH, RIF, PZA, EMB (6)	No	NR	NR
Cansu; 2011	Cadera	46/F	Ninguno	Luxación	4 meses	NR	NR	RX, TC	NR	Cultivo de ArC	Ninguno	INH, RIF, EMB (16), PZA (3)	No	NR	72 meses
Marshall; 2007	Rodilla	48/M	SIDA	Osteoartritis	6 meses	NR	NR	RX, RMIN	NR	Cultivo, microscopía y PCR de ArC	Pulmón, SNC	INH, PZA, EMB (1), MOX (½), RIF (½)	No	NR	Murió durante la terapia
Present work, case 1	Rodilla	34/F	Ninguno	Artritis reumatoide	8 meses	NR	NR	RX, RMIN, LLS, PET	Inflamación crónica	Cultivo de ArC	Ninguno	INH, RIF (18), PZA, EMB (2)	No	NR	24 meses
Jhonson; 1979	Cadera	51/F	tb cadera 41 años atrás	Osteoartritis por consecuencia de TB	13 meses	NR	<i>S. albus</i>	RX	NR	Cultivo de ArC	Ninguno	INH, RIF, EMB (en terapia)	No	NR	En terapia al publicar
Shanbha; 2007	Cadera	59/F	tb cadera 41 años atrás	Osteoartritis	14 meses	2 meses	Estafilococo	RX, RMIN	ICG	Cultivo de ArC	Ninguno	RIF, PZA, EMB (12)	No	NR	18 meses
De Nardo; 2012	Cadera	67/F	Ninguno	NR	16 meses	3 meses	NR	CT, LLC	Inflamación crónica activa	Cultivo de ArC	Psoas muscle, adrenals	INH RIF (on therapy), PZA, EMB (3)	No	NR	En terapia al publicar
Lee; 2012	Cadera	62/M	Ninguno	Fractura	8 años	NR	NR	Rx, US, CT	Inflamación crónica activa	Intraoperative microscopy and cultures	Ninguno	INH, RIF, PZA, EMB (6)	No	NR	24 meses
Neogi; 2009	Rodilla	73/F	Ninguno	Osteoartritis	14 años	2 meses	NR	RX	Inflamación crónica granulomatosa	Arthrocentesis PCR	Ninguno	INH, RIF (18), PZA (7), EMB (4)	No	NR	36 meses
Egues Dubuc; 2014	Rodilla	77/F	Terapia anti-TNF	Artritis reumatoide	NR	1 año	NR	US, Scint	NR	Arthrocentesis PCR	Lung, small intestine	INH, RIF, PZA (on therapy)	No	NR	En terapia al publicar

Biopelículas de *M. tuberculosis* en seres humanos

No se comprende completamente el papel clínico de las biopelículas de *M. tuberculosis* en humanos. Basaraba y Ojha [7] proporcionan argumentos convincentes de que la *M. tuberculosis* extracelular en las lesiones necrotizantes probablemente crezca como biopelículas. Por lo tanto, las biopelículas de micobacterias pueden participar en el proceso de necrosis caseosa y formación de cavitación en el tejido pulmonar [5-7].

Biopelículas de *M. tuberculosis* en la superficie de metal

La gran mayoría de los estudios que investigan las biopelículas de *M. tuberculosis* utilizan placas de poliestireno [8]. Ha *et al.* [9] compararon la adherencia y la formación de biofilms de *S. epidermidis* con las de *M. tuberculosis* en cuatro tipos de segmentos metálicos. A diferencia de *S. epidermidis*, *M. tuberculosis* rara vez se adhirió a las superficies metálicas y mostró una discreta formación de biofilm. Resultados similares fueron reportados por Chen *et al.* [10] que compararon *S. aureus* y *M. tuberculosis* *in vitro* e *in vivo*. Adetunji *et al.* [11] analizaron las formaciones biológicas de *M. tuberculosis* en piezas de cemento, cerámica o acero inoxidable. Las condiciones experimentales en este estudio son difíciles de transferir en un modelo de implante *in vivo* (por ejemplo, se formaron más biofilms cuando se utilizaron medios que contenían 5% de extracto de hígado). Sin embargo, se formaron más biofilms con cemento que en la cerámica y acero inoxidable [11]. Tomados en conjunto, los pocos datos disponibles de los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la formación de biopelículas de *M. tuberculosis* en segmentos metálicos es pobre en comparación con *Staphylococcus spp.*

Entre los 66 casos reportados por Veloci *et al.* [12], 13 (19,6%) fueron tratados solo con agentes antituberculosos. Por lo tanto, en estos casos no se realizó ninguna intervención quirúrgica para reducir la carga micobacteriana o para eliminar mecánicamente el biofilm que se adhiere al implante. Un paciente falleció a causa de meningitis tuberculosa muy avanzada, tuberculosis miliar de los pulmones, osteomielitis femoral y abscesos fríos extendidos a lo largo del eje femoral [13]. En los otros casos, no se reportaron fallos. Aunque solo en 6 (50%) de los 12 casos, hubo resultados de seguimiento de ≥ 18 meses

después del final de la terapia. La duración del tratamiento varió de 6 a 18 meses. Estos datos indican que la erradicación de la biopelícula tuberculosa es posible solo con quimioterapia. No se puede evaluar si esto se debe a una formación deficiente de la biopelícula en los implantes metálicos o debido a una actividad anti-biofilm-efectiva de los agentes antituberculosos.

REFERENCIAS

- [1] Brennan MJ. Biofilms and Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 2017;85. doi:10.1128/IAI.00411-17.
- [2] Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:623-633. doi:10.1038/nrmicro2415.
- [3] Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, et al. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol.* 2008;69:164-174. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x.
- [4] Van Wyk N, Navarro D, Blaise M, Berrin J-G, Henrissat B, Drancourt M, et al. Characterization of a mycobacterial cellulase and its impact on biofilm- and drug-induced cellulose production. *Glycobiology.* 2017;27:392-399. doi:10.1093/glycob/cwx014.
- [5] Esteban J, García-Coca M. Mycobacterium biofilms. *Front Microbiol.* 2017;8:2651. doi:10.3389/fmicb.2017.02651.
- [6] Trivedi A, Mavi PS, Bhatt D, Kumar A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun.* 2016;7:11392. doi:10.1038/ncomms11392.
- [7] Basaraba RJ, Ojha AK. Mycobacterial Biofilms: revisiting tuberculosis bacilli in extracellular necrotizing lesions. *Microbiol Spectr.* 2017;5. doi:10.1128/microbiolspec.TBTB2-0024-2016.
- [8] Pang JM, Layre E, Sweet L, Sherrid A, Moody DB, Ojha A, et al. The polyketide PksI contributes to biofilm formation in Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol.* 2012;194:715-721. doi:10.1128/JB.06304-11.
- [9] Ha K-Y, Chung Y-G, Ryoo S-J. Adherence and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis and Mycobacterium tuberculosis on various spinal implants. *Spine.* 2005;30:38-43.
- [10] Chen W-H, Jiang L-S, Dai L-Y. Influence of bacteria on spinal implant-centered infection: an in vitro and in vivo experimental comparison between Staphylococcus aureus and mycobacterium tuberculosis. *Spine.* 2011;36:103-108. doi:10.1097/BRS.0b013e3181cb46ba.
- [11] Adetunji V, Kehinde A, Bolatito O, Chen J. Biofilms formed by Mycobacterium tuberculosis on cement, ceramic, and stainless steel surfaces and their controls. *J Food Prot.* 2014;77:599-604. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-232.
- [12] Veloci S, Mencarini J, Lagi F, Beltrami G, Campanacci DA, Bartoloni A, et al. Tubercular prosthetic joint infection: two case reports and literature review. *Infection.* 2018;46:55-68. doi:10.1007/s15010-017-1085-1.
- [13] Marschall J, Evison J-M, Droz S, Studer UC, Zimmerli S. Disseminated tuberculosis following total knee arthroplasty in an HIV patient. *Infection.* 2008;36:274-278. doi:10.1007/s15010-007-7011-1.



Autores: Igor Shubnyakov, Guillermo A. Bonilla León, Timothy L. Tan, Vanya Gant

PREGUNTA 7: ¿Cuál es el papel de la sinergia microbiana en las infecciones polimicrobianas?

RESPUESTA: En las infecciones polimicrobianas, se puede formar un entorno complejo en el que existen interacciones microbiológicas entre los microorganismos. Existe evidencia científica que demuestra que pueden existir combinaciones de especies bacterianas, por lo que éstas pueden protegerse mutuamente de la acción de los antibióticos a través del intercambio de genes de resistencia a la virulencia y a los antibióticos, y esto puede ser evidente en los resultados adversos para las infecciones polimicrobianas relacionadas con implantes ortopédicos. También es probable que las infecciones polimicrobianas sean más probables en pacientes con inmunidad y curación tisular deficiente.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Se han notificado diversas incidencias de infecciones polimicrobianas con tasas que oscilan entre el 6% y el 37% [1-5]. La literatura demuestra constantemente que los pacientes con una infección polimicrobiana muestran resultados de tratamiento inferiores. Tan *et al.* informaron que los pacientes donde la infección peri-

protésica articular era polimicrobiana (IAP) tenían una mayor tasa de fracaso (50,5%) en comparación con las IAP monomicrobiana (31,5%) y una mayor tasa de amputación (*odds ratio* [OR] 3,80), artrodesis (OR 11,06) y mortalidad (OR 7,88) [2]. Del mismo modo, Wimmer *et al.* demostraron que la tasa de infección libre

después de dos años fue de 67,6% para infecciones polimicrobianas versus 87,5% para infecciones monomicrobianas en una serie de 77 IAPs polimicrobianas [6]. Además, Marculescu *et al.* demostraron que la probabilidad acumulada de 2 años de éxito de las IAP polimicrobianas fue del 63,8% en comparación con el 72,8% de las IAP monomicrobianas [7].

Hay varias explicaciones para el aumento de la tasa de fracaso en pacientes con IAP polimicrobiana. Algunas explicaciones de la infección polimicrobiana incluyen las siguientes: la asociación con un trayecto fistuloso o un defecto de cobertura; la presencia frecuente de organismos difíciles de tratar, como *Enterococcus spp* y Gram negativos [2,7,8]; aumento de las comorbilidades [2,7]; y sinergia microbiana.

La sinergia microbiana se define como una interacción de dos o más microbios en un sitio de infección que produce una enfermedad más agresiva y/o más difícil de erradicar al crear condiciones más favorables para ambas especies en comparación con infecciones que contienen un solo organismo [9,10]. De acuerdo con esta definición, se puede apreciar que la infección polimicrobiana tiene un resultado menos óptimo que el de las infecciones monomicrobianas debido a la mayor persistencia de patógenos en el sitio de la infección, el aumento de la gravedad de la enfermedad y/o la resistencia antimicrobiana [10,11]. Si bien la sinergia microbiana da como resultado una enfermedad peor, los datos experimentales reales que respaldan este fenómeno son todavía limitados [12-14], lo que puede estar relacionado con la compleja y dinámica red de interacciones que ocurren en los sistemas naturales [15].

Los tipos identificados de infecciones polimicrobianas se deben a: (1) cambios en la composición relativa de especies individuales de microbiota [16]; (2) colonización de un microbio patógeno de un sitio de infección que ya contiene microbios comensales (saprofitos); y (3) la colonización de un microbio patógeno en un cuerpo que normalmente no habitan [17].

Se han propuesto varios mecanismos de sinergia microbiana para explicar las interacciones de los microorganismos durante las infecciones polimicrobianas. (1) Aporte cruzado de metabolitos, en que una de las comunidades microbianas consume como nutriente productos finales del metabolismo (desechos metabólicos) de otra de las especies microbianas involucradas, lo cual genera una optimización del entorno local en lo referente a dichos productos finales del metabolismo [9,18,19]. (2) Sistemas de señalización dedicados: capacidad de muchos microorganismos para comunicarse y coordinar actividades en grupo a través de señales químicas de bajo peso molecular, el "quorum sensing" [20]. (3) Estimulación de la resistencia al sistema inmunitario: producción de sustancias químicas que inducen resistencia al sistema inmunitario como las proteínas de la membrana externa que inhiben las vías inmunitarias [9,18]. (4) Supresión de la acción del sistema inmunológico contra las bacterias comensales (saprofitas): promoción del entorno de crecimiento para patógenos comensales o saprofitos [9, 21, 22]. (5) Contacto directo: diferentes especies de microorganismos producen exopolisacáridos que interactúan entre sí y con las adhesinas unidas al material (capa de acondicionamiento) formando un biofilm conjunto [23,24]. Y (6) aumento de la virulencia de los organismos: producción de sustancias que aumentan la virulencia de otras bacterias [9].

REFERENCIAS

- [1] Holleyman RJ, Baker P, Charlett A, Gould K, Deehan DJ. Microorganisms responsible for periprosthetic knee infections in England and Wales. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24:3080-3087. doi:10.1007/s00167-015-3539-2.
- [2] Tan TL, Kheir MM, Tan DD, Parvizi J. Polymicrobial periprosthetic joint infections: outcome of treatment and identification of risk factors. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98:2082-2088. doi:10.2106/JBJS.15.01450.
- [3] Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1710-1715. doi:10.1007/s11999-008-0209-4.
- [4] Moran E, Masters S, Berendt AR, McLardy-Smith P, Byren I, Atkins BL. Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: the microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. *J Infect.* 2007;55:1-7. doi:10.1016/j.jinf.2007.01.007.
- [5] Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PFM. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:2386-2391. doi:10.1128/AAC.06246-11.
- [6] Wimmer MD, Friedrich MJ, Randau TM, Ploeger MM, Schmolders J, Strauss AA, et al. Polymicrobial infections reduce the cure rate in prosthetic joint infections: outcome analysis with two-stage exchange and follow-up \geq two years. *Int Orthop.* 2016;40:1367-1373. doi:10.1007/s00264-015-2871-y.
- [7] Marculescu CE, Cantej JR. Polymicrobial prosthetic joint infections: risk factors and outcome. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1397-1404. doi:10.1007/s11999-008-0230-7.
- [8] Bozhkova S, Tikhilov R, Labutin D, Denisov A, Shubnyakov I, Razorenov V, et al. Failure of the first step of two-stage revision due to polymicrobial prosthetic joint infection of the hip. *J Orthop Traumatol.* 2016;17:369-376. doi:10.1007/s10195-016-0417-8.
- [9] Rotstein OD, Pruett TL, Simmons RL. Mechanisms of microbial synergy in polymicrobial surgical infections. *Rev Infect Dis.* 1985;7(2):151-170. doi:10.1093/clinids/7.2.151.
- [10] Murray JL, Connell JL, Stacy A, Turner KH, Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol.* 2014;52:188-199. doi:10.1007/s12275-014-4067-3.
- [11] Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:193-213. doi:10.1128/CMR.00013-11.
- [12] Onderdonk AB, Bartlett JG, Louie T, Sullivan-Seigler N, Gorbach SL. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infect Immun.* 1976;13:22-26.
- [13] Araki H, Kuriyama T, Nakagawa K, Karasawa T. The microbial synergy of *Peptostreptococcus micros* and *Prevotella intermedia* in a murine abscess model. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:177-181. doi:10.1111/j.0902-0055.2004.00138.x.
- [14] Korgaonkar A, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:1059-1064. doi:10.1073/pnas.1214550110.
- [15] Gabriliska RA, Rumbaugh KP. Biofilm models of polymicrobial infection. *Future Microbiol.* 2015;10:1997-2015. doi:10.2217/fmb.15.109.
- [16] Wang J, Qi J, Zhao H, He S, Zhang Y, Wei S, et al. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci Rep.* 2013;3:1843. doi:10.1038/srep01843.
- [17] Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol.* 1996;34:537-542.
- [18] Ramsey MM, Whiteley M. Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:1578-1583. doi:10.1073/pnas.0809533106.
- [19] Ramsey MM, Rumbaugh KP, Whiteley M. Metabolite cross-feeding enhances virulence in a model polymicrobial infection. *PLoS Pathogens.* 2011;7:e1002012. doi:10.1371/journal.ppat.1002012.
- [20] Cook LC, LaSarre B, Federle MJ. Interspecies communication among commensal and pathogenic *Streptococci*. *MBio.* 2013;4:e00382-13. doi:10.1128/mBio.00382-13.
- [21] Murray JL, Connell JL, Stacy A, Turner KH, Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol.* 2014;52(3):188-199. doi:10.1007/s12275-014-4067-3.
- [22] Mackowiak PA. Microbial synergism in human infections (second of two parts). *N Engl J Med.* 1978;298:83-87. doi:10.1056/NEJM197801122980206.
- [23] Yamada M, Ikegami A, Kuramitsu HK. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;250:271-277. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.019.
- [24] Valm AM, Welch JLM, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:4152-4157. doi:10.1073/pnas.110134108.

Autores: Karan Goswami, Paul Stoodley, Garth D Ehrlich, James P. Moley, Alex C. DiBartola, Joshua S. Everhart

PREGUNTA 8: ¿Es la ubicación del biofilm en un componente protésico concreto o en una ubicación anatómica específica una consideración importante en el manejo del implante infectado?

RESPUESTA: En la actualidad, el análisis de la ubicación de las biopelículas solo es posible en el laboratorio, no en el contexto clínico. Por lo tanto, es de importancia clínica desconocida en relación con el tratamiento de infecciones relacionadas con implantes.

NIVEL DE EVIDENCIA: Consenso

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%; en desacuerdo: 0%; abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte).

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Las prótesis articulares se han convertido en una herramienta vital para el tratamiento de la artrosis en las avanzadas de rodilla y cadera y tienen el potencial de mejorar sustancialmente la calidad de vida de un paciente. Sin embargo, la infección articular periprotésica (IAP) es una temida complicación de estos procedimientos porque obliga a costosos antibióticos intravenosos, estancias más prolongadas en el hospital y numerosos efectos negativos relacionados con la morbilidad del paciente [1]. Ocurren en el 0,5-2% de todos los procedimientos primarios de artroplastia total, y a menudo involucran el crecimiento de bacterias en un complejo compuesto de matriz celular y extracelular, conocido como biofilm [2,3]. La ubicación exacta o la predilección por el crecimiento de las biopelículas en componentes o materiales protésicos específicos sigue siendo una pregunta importante, aunque poco estudiada. No hay evidencia en la literatura que haya demostrado la formación de biofilm en un tipo o ubicación específica de biomaterial o que haya demostrado la importancia de dicha ubicación en el manejo de infecciones relacionadas con implantes.

Las investigaciones anteriores que examinaron el papel de los biofilms en la virulencia de la IAP se centran principalmente en los métodos de detección, las modalidades de imagen y la clasificación bacteriana. Si bien el análisis de componentes aislados no suele ser un enfoque principal, algunos trabajos han examinado patrones de formación de bacterias que ofrecen una visión preliminar. Stoodley *et al.* [4] han demostrado que las proteínas fluorescentes coloreadas pueden utilizarse para observar directamente los biofilms de *P. aeruginosa* en tornillos de acero inoxidable. Se observó un desarrollo irregular en los vástagos de los tornillos y entre las roscas de varios tornillos, sin que se observara un patrón significativo de desarrollo.

También se ha demostrado que la microscopía de escaneo láser confocal ayuda a la visualización de biofilm en implantes y tejido circundante [5]; sin embargo, no existe un estudio dedicado a la formación preferencial de biopelícula sobre componentes específicos o regiones anatómicas. Kobayashi *et al.* [6] y Nguyen *et al.* [7] han demostrado la utilidad de la sonicación en la detección de biopelículas en casos de IAP, lo que demuestra que la exposición breve (de uno a cinco minutos) de los componentes infectados a los ultrasonidos es una técnica efectiva para detectar la adherencia bacteriana. Sin embargo, se demostró que pocos componentes albergan bacterias y los que lo hicieron no se examinaron para determinar la variabilidad anatómica o específica del componente. El trabajo preliminar de Gómez-Barrena *et al.* [8] no mostró una diferencia significativa entre los componentes de la cadera y la rodilla al albergar la formación de biofilm bacteriano. Si bien este trabajo se centró principalmente en la patogenia de varios microorganismos y los componentes sólo fueron clasificados como "cadera" o "rodilla", el hallazgo de que el tipo de componente no afectó la adherencia muestra indicaciones primarias de que la cartografía de la formación de biofilm puede no ser importante para la gestión de las IAPs. La investigación existente

con respecto a la ubicación específica del biofilm no está completa y no se puede definir su importancia. Serían interesantes trabajos adicionales para replicar experimentos preliminares y estudiar directamente la ubicación de la formación de biofilm en los diferentes componentes ortopédicos.

Otro aspecto a considerar es la composición química de los biomateriales ortopédicos y su posible capacidad para albergar biofilm. Sheehan *et al.* compararon los componentes de acero inoxidable y titanio utilizando cepas aisladas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en un modelo de implantación intramedular femoral en conejos [9]. Este estudio demostró niveles más altos de adherencia del biofilm a componentes de acero inoxidable dentro de las primeras 48 horas. Ambas cepas mostraron este crecimiento preferencial, con niveles más altos de adherencia que alcanzaron casi el 150% en acero inoxidable en comparación con el titanio. Tuke *et al.* ampliaron el trabajo para analizar el papel potencial de las superficies del par de fricción metal-metal [10]. Se observó que se formaba un área de desgaste en los dispositivos fallidos recuperados, lo que indicaba una posible oportunidad para la colonización bacteriana. Estos estudios demuestran la posibilidad de una variación específica del material en la formación de biofilm. Parece posible que componentes específicos, debido a su composición química o posición anatómica, puedan ser más susceptibles a la colonización bacteriana con cepas asociadas a IAP. Sin embargo, hay una falta de evidencia con respecto a los materiales comúnmente utilizados en los dispositivos de implantes, disponiendo sólo de datos preliminares y especulativos para un mejor manejo quirúrgico.

Dado el número limitado de estudios que evalúan la ubicación de las biopelículas en componentes específicos aislados de pacientes con IAP, ya sea clínicamente o en el laboratorio, se concluye que no hay pruebas sólidas de que la formación de biofilm favorezca una ubicación específica o un tipo de material en las artroplastias. Como anécdota, parece intuitivo que el conocimiento de la ubicación de los biofilm ayudaría en la terapia quirúrgica, y un artículo reciente argumenta que una disolución con actividad antibiofilm usada intraoperatoriamente sería una herramienta quirúrgica útil [11]. Sin embargo, la falta de evidencia en la literatura impide obtener conclusión alguna sobre la eventual importancia de la ubicación específica de las biopelículas en un componente en particular o que esto relevancia clínica.

REFERENCIAS

- [1] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351:1645-1654. doi:10.1056/NEJMra040181.
- [2] Nistico L, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Imaging bacteria and biofilms on hardware and periprosthetic tissue in orthopedic infections. *Methods Mol Biol.* 2014;1147:105-126. doi:10.1007/978-1-4939-0467-9_8.
- [3] Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade J-P, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, et al. Staphylococcus epidermidis in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS ONE.* 2013;8:e67240. doi:10.1371/journal.pone.0067240.

- [4] Stoodley P, Kathju S, Hu FZ, Erdos G, Levenson JE, Mehta N, et al. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. *Clin Orthop Rel Res.* 2005;437:31-40. doi:10.1097/01.blo.0000175129.83084.d5.
- [5] Stoodley P, Nistico L, Johnson S, Lasko L-A, Baratz M, Gahlot V, et al. Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90:1751-1758. doi:10.2106/JBJS.G.00838.
- [6] Kobayashi N, Bauer TW, Tuohy MJ, Fujishiro T, Procop GW. Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant. *Clin Orthop Rel Res.* 2007;457:210-213. doi:10.1097/BLO.0b013e3180312042.
- [7] Nguyen LL, Nelson CL, Saccente M, Smeltzer MS, Wassell DL, McLaren SG. Detecting bacterial colonization of implanted orthopaedic devices by ultrasonication. *Clin Orthop Rel Res.* 2002;403:29-37. doi:10.1097/00003086-200210000-00006.
- [8] Gómez-Barrena E, Esteban J, Medel F, Molina-Manso D, Ortiz-Pérez A, Cordero-Ampuero J, et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. *J Orthop Res.* 2012;30:1634-1639. doi:10.1002/jor.22114.
- [9] Sheehan E, McKenna J, Mulhall KJ, Marks P, McCormack D. Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an in vivo study. *J Orthop Res.* 2004;22:39-43. doi:10.1016/s0736-0266(03)00152-9.
- [10] Tuke MA, Scott G, Roques A, Hu XQ, Taylor A. Design considerations and life prediction of metal-on-metal bearings: the effect of clearance. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90:134-141. doi:10.2106/JBJS.H.00610.
- [11] Parry JA, Karau MJ, Kakar S, Hanssen AD, Patel R, Abdel MP. Disclosing agents for the intraoperative identification of biofilms on orthopedic implants. *J Arthroplasty.* 2017;32:2501-2504. doi:10.1016/j.arth.2017.03.010.



Autores: Alex McLaren, Garth D. Ehrlich

PREGUNTA 1: ¿Existe evidencia de que la interferencia de comunicación bacteriana al bloquear el “*quorum sensing*” pueda minimizar la formación de biofilm *in vivo*?

RESPUESTA: Los estudios *in vivo* en animales han demostrado que la interferencia con las señales/moléculas de “*quorum sensing*” en algunas infecciones conduce a una disminución en la formación de biofilm. Hay resultados contradictorios en las especies de *Staphylococcus*. Sin embargo, no hay estudios clínicos que demuestren este fenómeno.

NIVEL DE EVIDENCIA: Limitado

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%, en desacuerdo: 0%, abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte)

JUSTIFICACIÓN PREVIA LA REUNIÓN

Si bien se han realizado múltiples trabajos *in vitro* sobre las moléculas de “*quorum sensing*” y de “*anti-quorum sensing*”, también conocidas como extinción de quórum, las investigaciones *in vivo* son limitadas y ninguna de las estrategias están preparadas para aplicación clínica generalizada. Sobre la base de una búsqueda en las bases de datos NCBI, Embase y Scopus, hay siete investigaciones *in vivo* durante los últimos

cinco años [1-7] (Tabla 1). Además, ha habido informes de inhibidores del “*quorum sensing*” y estudios de extinción del quórum presentados en reuniones científicas utilizando múltiples modelos *in vivo* [8].

La estrategia experimental varía. Se confía en los datos *in vitro* para identificar el mecanismo molecular que conduce a la interferencia con el quórum “*quorum sensing*” con la que se obtiene una disminu-

TABLA 1. Siete estudios *in vivo* en los últimos cinco años

Estudio	Modelo animal	Agente	Mecanismo	Efecto clínico
1 [1]	Infección del catéter peritoneal de peces medaka	Acido 3-fenilacético	Se une de manera antagonista a los receptores de detección de quórum RhIR y RqsR, bloqueando el ataque inicial de <i>P. aeruginosa</i> (PA01), lo que retrasa la formación de biofilm [1]	Disminución de la formación del biofilm
2 [7]	Pielonefritis de rata Wistar	Phytol	Los genes regulados a menos o A mA, fi mC, fl hC, fl hD, bsmB, pigP shlA en <i>S. marcescens</i> conducen a una menor formación de biofilm y producción de factor de virulencia	Disminución de recuentos bacterianos y enzimas de virulencia (lipasa y proteasa), disminución de marcadores inflamatorios (MDA, NO, MPO), histológicamente no hay inflamación aguda
3 [2]	Gingivitis en ratones	Inhibidores de “ <i>quorum sensing</i> ” (compuestos de furano, d-ribosa)	Interferencia del autoinductor -2	Disminución del número de colonias y de la pérdida de hueso alveolar.
4 [4]	Supervivencia del gusano redondo (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Concentración de Cefotaxima subinhibitoria	Inhibición de los rasgos de virulencia regulados por QS y formación de biofilm; se une a los receptores QS las y pqs en <i>P. aeruginosa</i>	Supervivencia aumentada
5 [5]		Acylyase	Péptidos degradados de “ <i>quorum sensing</i> ”	Retrasar la formación de biofilm para <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> hasta por 7 días.
6 [6]	Mortalidad de la Ostra Larval	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> S4Sm	Regula a la baja los genes de virulencia del patógeno.	Disminución de la mortalidad por infección por <i>V. tubiashii</i>
7 [3]	Supervivencia del gusano redondo (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Pyrrolo (1,2-a) pyrazine1, 4-dione, hexahydro3-(2-methylpropyl) de <i>Alcaligenes faecalis</i>	Expresión modular de los reguladores de “ <i>quorum sensing</i> ” (QS) luxT y lafK	Aumento de la supervivencia tras infección por <i>V. alginolyticus</i>

ción en la formación de biofilm, ya sea bloqueando la producción de péptidos de señalización, bloqueando los receptores o iniciando de forma activa las señales antagonistas del agente. Los datos *in vivo* confirman que el agente disminuye la formación de biofilm.

REFERENCIAS

- [1] Chatterjee M, D'Morris S, Paul V, Warriar S, Vasudevan AK, Vanuopadath M, et al. Mechanistic understanding of Phenylactic acid mediated inhibition of quorum sensing and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:8223–8236. doi:10.1007/s00253-017-8546-4.
- [2] Cho Y-J, Song HY, Ben Amara H, Choi B-K, Eunju R, Cho Y-A, et al. In vivo Inhibition of porphyromonas gingivalis growth and prevention of periodontitis with quorum-sensing inhibitors. *J Periodontol*. 2016;87:1075–1082. doi:10.1902/jop.2016.160070.
- [3] Durai S, Vigneshwari L, Balamurugan K. Caenorhabditis elegans-based in vivo screening of bioactives from marine sponge-associated bacteria against *Vibrio alginolyticus*. *J Appl Microbiol*. 2013;115:1329–1342. doi:10.1111/jam.12335.
- [4] Husain FM, Ahmad I, Baig MH, Khan MS, Khan MS, Hassan I, et al. Broad-spectrum inhibition of AHL-regulated virulence factors and biofilms by sub-inhibitory concentrations of ceftazidime. *RSC Advances*. 2016;6:27952–27962. doi:10.1039/c6ra02704k.
- [5] Ivanova K, Fernandes MM, Francesko A, Mendoza E, Guezguez J, Burnet M, et al. Quorum-quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary catheters. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:27066–27077. doi:10.1021/acami.5b09489.
- [6] Rowley D, Zhao W, Yuan T, Dao C, Sohn S, Gomez Chiarri M, et al. Mechanisms of microbe-microbe-host interactions in a probiotic-pathogen-bivalve model. *Planta Med*. 2015;81. doi:10.1055/s00351556118.
- [7] Srinivasan R, Mohankumar R, Kannappan A, Karthick Raja V, Archunan G, Karutha Pandian S, et al. Exploring the anti-quorum sensing and antibiofilm efficacy of Phytol against *Serratia marcescens* associated acute pyelonephritis infection in Wistar rats. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:498. doi:10.3389/fcimb.2017.00498.
- [8] Coenye T. Quorum quenching and quorum sensing inhibition to fight biofilm-related infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42:S15–S16. doi:10.1016/S0924-8579(13)70164-X.



Autores: Yixin Zhou, Matt hew Kheir, Valentia Antoci, Luigi Zagra

PREGUNTA 2: ¿Se puede modificar una superficie de biomaterial para evitar la adherencia bacteriana y los biofilm? ¿Cuáles son las preocupaciones potenciales en la modificación de las superficies de los implantes para combatir las biopelículas?

RESPUESTA: El propósito de la modificación de la superficie es disminuir la adherencia bacteriana perioperatoria y prevenir así la formación de biofilm. Esto se ha demostrado en estudios *in vitro* y modelos animales *in vivo*. Se han ideado numerosas estrategias para alterar las superficies. Tales superficies modificadas pueden interferir con la osteointegración esperada, la estabilidad mecánica y la capacidad de supervivencia del implante a largo plazo. La duración de los efectos antiinfecciosos a largo plazo es desconocida. Hasta la fecha, ningún efecto *in vitro* positivo se ha traducido en un contexto clínico.

NIVEL DE EVIDENCIA: Consenso

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%, en desacuerdo: 0%, abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte)

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Las infecciones articulares periprotésicas (IAP) representan del 1 al 20% de los fracasos en las artroplastias y además generan una morbilidad y mortalidad significativas [1 a 3]. La superficie del material utilizado en la implantación es un factor importante en la colonización bacteriana que conduce a IAP [4,5]. Algunas superficies son más propensas a la adherencia bacteriana y la formación de biofilms. Una biopelícula es un agregado de células microbianas que se asocian de manera irreversible con una superficie y se encapsulan en una matriz extracelular de "limo" de polisacárido complejo que puede incluir enzimas, cristales y glicoproteínas, el conjunto de todo lo cual forma un tejido vivo [6,7]. Los microorganismos más comunes que residen en las biopelículas son especies de *Staphylococcus* [8,9]. Las biopelículas adoptan formas sésiles sobre las superficies de metal, fragmentos de huesos y cemento; las bacterias también pueden encontrarse en forma planctónica y así pueden dispersarse dentro del líquido de la articulación [10,11]. Debido a la complejidad de todo este proceso multifactorial, la pregunta sigue siendo si las superficies modificadas del implante pueden desempeñar un papel antiinfeccioso y cuáles son las principales preocupaciones con respecto a la modificación de los dispositivos biomédicos.

¿Puede modificarse la superficie de un biomaterial para evitar la adherencia bacteriana y la biopelícula?

En 1987, Anthony Gristina [12] fue el primero en proponer el concepto de carrera por la superficie, en el que el destino del implante de

biomaterial depende del equilibrio entre la integración tisular y la adhesión microbiana con la formación de biofilm. Este concepto establece la hipótesis de las modificaciones del material que mejorarían la osteointegración al tiempo que inhibirían la adhesión bacteriana, eliminando el riesgo de infección [13]. Como resultado, existe una amplia gama de superficies antiinfecciosas propuestas para su uso en aplicaciones de implantes ortopédicos. Gallo *et al.* [14] resumió las opciones disponibles como bactericidas, superficies antiadherentes, recubrimientos multifuncionales/inteligentes y materiales alternativos. Romano *et al.* [15] proponen un nuevo régimen de clasificación que describe el recubrimiento antibacteriano en tres grupos distintivos [1]:

1. Acabado/modificación pasiva de la superficie que evite la adhesión sin liberar sustancias antibacterianas.
2. Acabado/modificación de superficies activas que liberan sustancias antibacterianas.
3. Portadores o recubrimientos de antibacterianos perioperatorios (aplicados durante la cirugía) que pueden ser biodegradables o no biodegradables.

Las superficies activas y los recubrimientos perioperatorios proporcionan solo soluciones temporales mientras agotan sus antimicrobianos al cabo de un tiempo. Las superficies pasivas pueden no proporcionar las propiedades bactericidas necesarias para eliminar la infección, mientras que su acción se limita al área inmediata peri-

TABLA 1. Superficies antiinfecciosas propuestas para su uso en aplicaciones de implantes ortopédicos

Método	Tipo	Ejemplos
Bactericida	Inorgánico	Ag, AgNP, AuNP, TiO ₂ , Se, CuNP
	Orgánico	Antibióticos recubiertos o unidos covalentemente, derivados del quitosano.
	Combinado	Cobertura multicapa, polímeros cargados positivamente
	Otros	No antibióticos (péptidos, enzimas, aceites)
Anti-adhesión		Polímeros anti-adhesivos
Cobertura multifuncional/ inteligente	Pasivo	Materiales inteligentes nanoestructurados
	Activo	Sensores unidos a nanocontenedores
Alternativas		Bacteriófagos líticos

Ag: plata; NP: nanopartículas; TiO₂: óxido de titanio; Se: selenio; Cu: cobre.

implante. La superficie ideal del implante debe tener: (1) un fuerte potencial antiinfeccioso, (2) larga duración del efecto, (3) biocompatibilidad con la estabilidad mecánica y (4) respuesta del huésped y daño mínimos [16-18]. Para lograrlo, las superficies pueden prepararse física/mecánicamente y/o recubrirse/modificarse químicamente.

La etapa de adhesión reversible temprana de las bacterias al titanio está influenciada en gran medida por las características topográficas en la superficie [19]. Se han creado varios recubrimientos antiadherentes sobre titanio mediante modificación de la superficie con polímeros, copolímeros o proteínas. Del Curto *et al.* [20] han demostrado que la fase cristalina del óxido de titanio en la superficie de los biomateriales reduce la adhesión bacteriana sin efectos adversos en la biocompatibilidad. Ferraris *et al.* [21] demostraron que los nanoporos producidos mecánicamente (0.1-0.2 μm) y las nanofibras de queratina pueden aumentar la biocompatibilidad sin aumentar la adhesión bacteriana.

Lorenzetti *et al.* [19] han aplicado métodos de tratamiento hidrotérmico para lograr de manera similar una menor adhesión bacteriana. Estos datos son muy alentadores y apoyan el concepto de que las superficies de biomateriales pueden modificarse para evitar la adherencia bacteriana.

La plata (Ag) ha sido conocida a lo largo de la historia, no solo por sus aplicaciones de joyería, sino también por sus efectos antimicrobianos [22,23]. Se cree que el mecanismo de acción es la formación de especies reactivas de oxígeno e iones biológicamente activos que dañan las paredes bacterianas y se unen a los ácidos nucleicos e interrumpen la replicación bacteriana [24]. Una ventaja adicional del uso de Ag es el efecto contra las bacterias adheridas a la superficie sin una resistencia significativa al fármaco [25, 26]. Harrasser *et al.* [27] estudiaron los efectos antimicrobianos de Ag y han observado una actividad antimicrobiana significativa que se correlacionó positivamente con las concentraciones de Ag. Un estudio reciente de Aurore *et al.* [28] indicó que las nanopartículas de Ag (AgNPs) mejoraron la actividad bactericida en los osteoclastos. Como tales, las nanopartículas de Ag (AgNPs) han ganado atención para su aplicación en las superficies de los implantes debido a su potencial anti-biofilm, sus propiedades antimicrobianas de amplio espectro y su baja citotoxicidad para las células humanas [18,22,29-33]. Existe una gran cantidad de literatura que examina el efecto anti-biofilm de las AgNPs [18,25,34]. Kalishwaralal *et al.* [35] demostraron que las AgNPs a una concentración de 100 nM inhibían casi por completo la formación de biofilm (> 95%) de *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*. Slane *et al.* [33] encontraron que los cementos óseos impregnados con AgNPs

redujeron significativamente la formación de biofilm en comparación con el cemento estándar. Algunos estudios también han mencionado el efecto sinérgico de las AgNP con los antibióticos [36-38]. La ventaja más notable de las superficies recubiertas con AgNP es la capacidad de exhibir una liberación controlada continua de agentes activos a la región periprotésica durante un periodo de tiempo sustancial, por lo que funciona tanto en la capa superficial como en el entorno inmediato.

Se ha demostrado que el yodo es un adyuvante exitoso para la irrigación y el desbridamiento en casos de IAP [39]. Adaptando esto a la idea de implantar elementos de superficie, Tsuchiya *et al.* [40] informan sobre un estudio clínico de más de 222 pacientes en los que los implantes tratados con yodo en la superficie fueron muy efectivos para prevenir y tratar infecciones después de la cirugía ortopédica. No se observó citotoxicidad clara ni efectos adversos. Shirai *et al.* [41] demostraron de manera similar una reducción significativa en la tasa de infección de los pines mediante el uso de tratamiento con yodo en sus fijadores externos. Kabata *et al.* [42] también muestran que los implantes de cadera tratados con yodo permanecieron libres de infección en 14 casos de revisión por infección y en 16 artroplastias de cadera primarias inmunodeprimidas. En ninguno de estos estudios se han notificado problemas relacionados con la toxicidad local y sistémica o con la osteoconductividad y el enlace óseo deteriorados. Al igual que el Ag y el yodo, varios estudios han apuntado a la incorporación de antibióticos en los recubrimientos de superficie depositados directamente sobre el implante [43-45]. La mayoría de estas aplicaciones se basan en la información obtenida de los cementos óseos cargados de antibióticos y proporcionan una barrera protectora inicial para la infección [46-48]. Los protocolos actuales incluyen hidrogeles, poli-D, L-lactida, fosfato de calcio o recubrimientos antibióticos de hidroxiapatita. Otras técnicas directas intentan modificar físicamente la superficie para la adsorción de antibióticos, o simplemente sumergir el implante en antibióticos produciendo un recubrimiento transitorio [48-50]. El reciente progreso científico en las interacciones biomoleculares y la ingeniería a nanoescala proporciona una nueva inspiración para los diseños de implantes médicos que pueden tener el potencial de tratar una infección [51,52]. Se ha demostrado que los antibióticos unidos covalentemente a las superficies metálicas inhiben la colonización bacteriana tanto *in vitro* como *in vivo* [13,53,54]. A pesar de todos los avances, la mayoría de los sistemas son rudimentarios y difíciles de escalar a los estándares de la industria. Se necesita más investigación y una tecnología de implantes más inteligente. Dicha tecnología

debe integrar directamente las defensas biológicas en el diseño del implante, haciendo que la protección sea viable durante la vida útil de la prótesis.

¿Cuáles son los principales problemas para modificar las superficies de implantes en la lucha contra las biopelículas?

Una de las principales preocupaciones de los biomateriales antimicrobianos es el posible efecto citotóxico de la modificación de la superficie en relación con la osteointegración del implante y su supervivencia. Según una revisión preliminar de la literatura, solo cuatro estudios de laboratorio [55-58] y un estudio clínico [59] informaron de efectos secundarios por la modificación de la superficie. Las modificaciones de la superficie de Ag han mostrado una mayor actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador de muerte celular, así como menor recuento de células y menor actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) [55-58]. Sin embargo, tales efectos son difíciles de correlacionar con los resultados clínicos. Glehr *et al.* [59] realizó el único estudio clínico que se centró en Ag mientras examinaba su uso en megaprótesis; han documentado la presencia de síntomas de intoxicación por metales pesados, aunque no se observó correlación con la concentración de Ag en sangre. Otros dos estudios *in vitro* utilizaron modificaciones en la superficie de zinc y farnesol (fármaco antifúngico) respectivamente. Los resultados mostraron una menor actividad de ALP, así como daño celular a los preosteoblastos. Por lo tanto, varios estudios coinciden en que los AgNP tienen el potencial de ser tóxicos para muchos tipos de células de manera dependiente de la dosis y el tiempo, especialmente cuando se inhalan, se inyectan o se ingieren [60-62]. Curiosamente, Shen *et al.* [63] realizaron un estudio que reveló que tanto las aleaciones de cromo-cobalto como el titanio puro tenían efectos citotóxicos en las células precursoras osteogénicas y en las células madre mesenquimales, mientras que la incorporación de AgNPs redujo esta citotoxicidad.

Cuando se trabaja con superficies modificadas, las bacterias pueden, en última instancia, adaptarse y desarrollar resistencia al agente utilizado. La resistencia a los antibióticos es un hecho cotidiano en la práctica clínica. También se ha demostrado que las bacterias desarrollan resistencia a la forma iónica de Ag y, menos frecuentemente, a AgNPs [64,65]. Esto se debe a que la exposición prolongada a los AgNP, a diferencia de los iones Ag, es menos probable que dé como resultado genes de resistencia, ya que los AgNPs tienen capacidades de amplio espectro al atacar múltiples sitios en o dentro de las células bacterianas [66]. Sin embargo, la resistencia a la plata parece ser un proceso lento y es un problema menor en comparación con la resistencia a los antibióticos [67]. Sin embargo, Kaweeteerawat *et al.* [68] sugieren que los AgNP podrían potencialmente incrementar la resistencia bacteriana a los antibióticos al promover la tolerancia al estrés mediante la inducción de especies de oxígeno reactivas intracelulares que causan mutaciones en el ADN.

En conclusión, las biopelículas bacterianas son difíciles de penetrar por los agentes antimicrobianos. La prevención de las biopelículas y la adherencia bacteriana es probablemente la única forma efectiva de abordar el problema de la IAP. Las AgNPs y el yodo están ganando cada vez más popularidad, especialmente por sus propiedades antiadherentes, antiinfecciosas y de resistencia bacteriana mínima. Sin embargo, se justifica una investigación adicional de los resultados a largo plazo de los pacientes con implantes de superficie modificada.

REFERENCIAS

[1] Antoci V, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. Antibiotics for local delivery systems cause skeletal cell toxicity *in vitro*. Clin Orthop Relat Res. 2007;462:200-206. doi:10.1097/BLO.0b013e31811ff866.

[2] De Angelis G, Muters NT, Minkley L, Holderried F, Tacconelli E. Prosthetic joint infections in the elderly. Infection. 2015;43:629-637. doi:10.1007/s15010-015-0806-6.

[3] Gundtoft PH, Pedersen AB, Varnum C, Overgaard S. Increased mortality after prosthetic joint infection in primary THA. Clin Orthop Relat Res. 2017;475:2623-2631. doi:10.1007/s11999-017-5289-6.

[4] Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop. 2015;86:147-158. doi:10.3109/17453674.2014.966290.

[5] Rochford ETJ, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. Clin Microbiol Infect. 2012;18:1162-1167. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.04002.x.

[6] Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Bio-film Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. 1999;37:1771-1776.

[7] McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. Future Microbiol. 2014;9:987-1007. doi:10.2217/fmb.14.64.

[8] Gallo J, Kolar M, Dendis M, Loveckova Y, Sauer P, Zapletalova J, et al. Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. New Microbiol. 2008;31:97-104.

[9] Choong PFM, Dowsey MM, Carr D, Daffy J, Stanley P. Risk factors associated with acute hip prosthetic joint infections and outcome of treatment with a rifampin-based regimen. Acta Orthop. 2007;78:755-765. doi:10.1080/17453670710014527.

[10] Stoodley P, Nistico L, Johnson S, Lasko L-A, Baratz M, Gahlvot V, et al. Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case report. J Bone Joint Surg Am. 2008;90:1751-1758. doi:10.2106/JBJS.G.00838.

[11] Urish KL, DeMuth PW, Kwan BW, Craft DW, Ma D, Haider H, et al. Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* biofilm persists on arthroplasty materials. Clin Orthop Relat Res. 2016;474:1649-1656. doi:10.1007/s11999-016-4720-8.

[12] Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. Science. 1987;237:1588-1595.

[13] Antoci V, Adams CS, Parvizi J, Ducheyne P, Shapiro IM, Hickok NJ. Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. Clin Orthop Relat Res. 2007;461:81-87. doi:10.1097/BLO.0b013e3181123a50.

[14] Gallo J, Panacek A, Pucek R, Kriegova E, Hradilova S, Hobza M, et al. Silver nanocoating technology in the prevention of prosthetic joint infection. Materials (Basel). 2016;9(5). doi:10.3390/ma9050337.

[15] Romanò CL, Scarponi S, Gallazzi E, Romanò D, Drago L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. J Orthop Surg Res. 2015;10:157. doi:10.1186/s13018-015-0294-5.

[16] Helmus MN, Gibbons DF, Cebon D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. Toxicol Pathol. 2008;36:70-80. doi:10.1177/0192623307310949.

[17] Bernthal NM, Stavakis AI, Billi F, Cho JS, Kremen TJ, Simon SI, et al. A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate *in vivo* the efficacy of antimicrobial implant coatings. PLoS ONE. 2010;5:e12580. doi:10.1371/journal.pone.0012580.

[18] Secinti KD, Özalp H, Attar A, Sargon MF. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. J Clin Neurosci. 2011;18:391-395. doi:10.1016/j.jocn.2010.06.022.

[19] Lorenzetti M, Dogša I, Stošički T, Stopar D, Kalin M, Kobe S, et al. The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7:1644-1651. doi:10.1021/am507148n.

[20] Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, Pedferri MP, Valtulina V, Visai L, et al. Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium. Int J Artif Organs. 2005;28:718-730.

[21] Ferraris S, Truffa Giachet F, Miola M, Bertone E, Varesano A, Vineis C, et al. Nanogrooves and keratin nanofibers on titanium surfaces aimed at driving gingival fibroblasts alignment and proliferation without increasing bacterial adhesion. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;76:1-12. doi:10.1016/j.msec.2017.02.152.

[22] Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial silver. Met Based Drugs. 1994;1:467-482. doi:10.1155/MBD.1994.467.

[23] Nair LS, Laurencin CT. Nanofibers and nanoparticles for orthopaedic surgery applications. J Bone Joint Surg Am. 2008;90 Suppl 1:128-31. doi:10.2106/JBJS.G.01520.

[24] Brennan SA, Ni Fhoghlú C, Devitt BM, O'Mahony FJ, Brabazon D, Walsh A. Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. Bone Joint J. 2015;97-B:582-589. doi:10.1302/0301-620X.97B5:33336.

[25] Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. Biomaterials. 2014;35:9114-125. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.07.040.

[26] Zhao Y, Cao H, Qin H, Cheng T, Qian S, Cheng M, et al. Balancing the osteogenic and antibacterial properties of titanium by codoping of Mg and Ag: an *in vitro* and *in vivo* study. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7:17826-17836. doi:10.1021/acsami.5b04168.

[27] Harrasser N, Jüssen S, Banke JJ, Kmeth R, von Eisenhart-Rothe R, Stritzker B, et al. Antibacterial efficacy of titanium-containing alloy with silver-nanoparticles enriched diamond-like carbon coatings. AMB Express. 2015;5:77. doi:10.1186/s13568-015-0162-z.

- [28] Aurore V, Caldana F, Blanchard M, Kharoubi Hess S, Lannes N, Mantel P-Y, et al. Silver-nanoparticles increase bactericidal activity and radical oxygen responses against bacterial pathogens in human osteoclasts. *Nanomedicine*. 2018;14:601–607. doi:10.1016/j.nano.2017.11.006.
- [29] Gallo J, Havranek V, Zapletalova J. Risk factors for accelerated polyethylene wear and osteolysis in ABG I total hip arthroplasty. *Int Orthop*. 2010;34:19–26. doi:10.1007/s00264-009-0731-3.
- [30] Romanò CL, Gala L, Logoluso N, Romanò D, Drago L. Two-stage revision of septic knee prosthesis with articulating knee spacers yields better infection eradication rate than one-stage or two-stage revision with static spacers. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20:2445–2453. doi:10.1007/s00167-012-1885-x.
- [31] Ionita D, Grecu M, Ungureanu C, Demetrescu I. Antimicrobial activity of the surface coatings on TiAlZr implant biomaterial. *J Biosci Bioeng*. 2011;112:630–634. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.07.022.
- [32] Darouiche RO. Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses. *Clin Infect Dis*. 1999;29:1371–1377; quiz 1378. doi:10.1086/313561.
- [33] Slane J, Vivanco J, Rose W, Ploeg H-L, Squire M. Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;48:188–196. doi:10.1016/j.msec.2014.11.068.
- [34] Jaiswal S, Bhattacharya K, McHale P, Duffy B. Dual effects of β -cyclodextrin-stabilised silver nanoparticles: enhanced biofilm inhibition and reduced cytotoxicity. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26:5367. doi:10.1007/s10856-014-5367-1.
- [35] Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SRK, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;79:340–344. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.014.
- [36] Wang J, Li J, Qian S, Guo G, Wang Q, Tang J, et al. Antibacterial surface design of titanium-based biomaterials for enhanced bacteria-killing and cell-assisting functions against periprosthetic joint infection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8:11162–11178. doi:10.1021/acsami.6b02803.
- [37] Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine*. 2010;6:103–109. doi:10.1016/j.nano.2009.04.006.
- [38] Naqvi SZH, Kiran U, Ali MI, Jamal A, Hameed A, Ahmed S, et al. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3187–3195. doi:10.2147/IJN.S49284.
- [39] Brown NM, Cipriano CA, Moric M, Sporer SM, Della Valle CJ. Dilute betadine lavage before closure for the prevention of acute postoperative deep periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty*. 2012;27:27–30. doi:10.1016/j.arth.2011.03.034.
- [40] Tsuchiya H, Shirai T, Nishida H, Murakami H, Kabata T, Yamamoto N, et al. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *J Orthop Sci*. 2012;17:595–604. doi:10.1007/s00776-012-0247-3.
- [41] Shirai T, Watanabe K, Matsubara H, Nomura I, Fujiwara H, Arai Y, et al. Prevention of pin tract infection with iodine-supported titanium pins. *J Orthop Sci*. 2014;19:598–602. doi:10.1007/s00776-014-0561-z.
- [42] Kabata T, Maeda T, Kajino Y, Hasegawa K, Inoue D, Yamamoto T, et al. Iodine-Supported Hip Implants: Short Term Clinical Results. *Biomed Res Int*. 2015;2015:368124. doi:10.1155/2015/368124.
- [43] Lin TL, Lu FM, Conroy S, Sheu MS, Su SH, Tang L. Antimicrobial coatings: a remedy for medical device-related infections. *Med Device Technol*. 2001;12:26–30.
- [44] Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*. 1997;18:777–782.
- [45] Radin S, Ducheyne P, Kamplain T, Tan BH. Silica sol-gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release. *J Biomed Mater Res*. 2001;57:313–320.
- [46] Ducheyne P, Van Raemdonck W, Heughebaert JC, Heughebaert M. Structural analysis of hydroxyapatite coatings on titanium. *Biomaterials*. 1986;7:97–103.
- [47] Stigter M, Bezemer J, de Groot K, Layrolle P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *J Control Release*. 2004;99:127–137. doi:10.1016/j.jconrel.2004.06.011.
- [48] Stigter M, de Groot K, Layrolle P. Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium. *Biomaterials*. 2002;23:4143–4153.
- [49] Dunn DS, Raghavan S, Volz RG. Gentamicin sulfate attachment and release from anodized Ti-6Al-4V orthopedic materials. *J Biomed Mater Res*. 1993;27:895–900. doi:10.1002/jbm.820270708.
- [50] Hayakawa T, Yoshinari M, Nemoto K. Characterization and protein-adsorption behavior of deposited organic thin film onto titanium by plasma polymerization with hexamethyldisiloxane. *Biomaterials*. 2004;25:119–127.
- [51] Simmons WC. Biomimetics and smart materials. vol. 3241, 1997, p. 3241–3248.
- [52] Jose B, Antoci V, Zeiger AR, Wickstrom E, Hickok NJ. Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills *Staphylococcus aureus*. *Chem Biol*. 2005;12:1041–1048. doi:10.1016/j.chembiol.2005.06.013.
- [53] Hickok NJ, Shapiro IM. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:1165–1176. doi:10.1016/j.addr.2012.03.015.
- [54] Antoci V, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection: preliminary study. *Clin Orthop Rel Res*. 2007;461:88–95. doi:10.1097/BLO.0b013e318073c2b2.
- [55] Zhao L, Wang H, Huo K, Cui L, Zhang W, Ni H, et al. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32:5706–5716. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.040.
- [56] Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirliff ME, Greenfield EM. The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. An in vitro study. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91:2683–2692. doi:10.2106/JBJS.H.01699.
- [57] Li Y, Xiong W, Zhang C, Gao B, Guan H, Cheng H, et al. Enhanced osseointegration and antibacterial action of zinc-loaded titania-nanotube-coated titanium substrates: in vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102:3939–3950. doi:10.1002/jbm.a.35060.
- [58] Xu Z, Wang X, Liu X, Cui Z, Yang X, Yeung KWK, et al. Tannic acid/Fe³⁺/Ag nanofilm exhibiting superior photodynamic and physical antibacterial activity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9:39657–39671. doi:10.1021/acsami.7b10818.
- [59] Glehr M, Leithner A, Friesenbichler J, Goessler W, Avian A, Andreou D, et al. Argyria following the use of silver-coated megaprotheses: no association during the development of local argyria and elevated silver levels. *Bone Joint J*. 2013;95-B:988–992. doi:10.1302/0301-620X.95B7.31124.
- [60] Lee KJ, Nallathambi PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu X-HN. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*. 2007;1:133–143. doi:10.1021/nn700048y.
- [61] AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009;3:279–290. doi:10.1021/nn800596w.
- [62] Gandjbakhch E, Varlet E, Duthoit G, Fressart V, Charron P, Himbert C, et al. Pregnancy and newborn outcomes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Int J Cardiol*. 2018;258:172–178. doi:10.1016/j.ijcard.2017.11.067.
- [63] Shen X-T, Zhang Y-Z, Xiao F, Zhu J, Zheng X-D. Effects on cytotoxicity and antibacterial properties of the incorporations of silver nanoparticles into the surface coating of dental alloys. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18:615–625. doi:10.1631/jzus.B1600555.
- [64] Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27:341–353.
- [65] Panáček A, Kvítek L, Směkalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol*. 2018;13:65–71. doi:10.1038/s41565-017-0013-y.
- [66] Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol*. 2013;60:523–530.
- [67] Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*. 2005;60:1–7. doi:10.1016/j.jhin.2004.11.014.
- [68] Kaweeteerawat C, Na Ubol P, Sangmuang S, Aueviriyavit S, Maniratanachote R. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver nanoparticles. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2017;80:1276–1289. doi:10.1080/015287394.2017.1376727.

PREGUNTA 3: ¿Cuál es la relevancia de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los organismos infectantes en una infección crónica mediada por biofilm?

RESPUESTA: El uso de la CIM se limita a (1) definir niveles de antibióticos a los que el microorganismo es susceptible en su estado planctónico, pero no se puede usar para guiar el tratamiento de bacterias en biofilm y (2) seleccionar regímenes de antibióticos supresores a largo plazo donde no se prevé la erradicación de la infección. Se deben desarrollar y validar medidas alternativas de la eficacia del antibiótico en el contexto del biofilm.

NIVEL DE EVIDENCIA: Fuerte

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%, en desacuerdo: 0%, abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte)

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Las CIM se utilizan para definir la susceptibilidad de un microorganismo individual (habitualmente bacterias) a una variedad distinta de antibióticos. Las metodologías establecidas para determinar las CIM se relacionan con el estado planctónico de las bacterias, pero no con las bacterias que viven en el biofilm [1].

La mayor parte de la información relacionada con las pruebas de susceptibilidad para bacterias que viven en biofilm proviene de investigaciones en Fibrosis Quística [2]. En relación con las infecciones por biopelículas asociadas a implantes, los catéteres venosos centrales y los catéteres del tracto urinario a menudo se investigan, pero se ha realizado muy poca investigación clínica en infecciones de biofilms asociadas con implantes ortopédicos [2,3]. Ya en 1990, Anwar y Costerton describieron, para tratar bacterias que viven en biofilm, la necesidad de un aumento extremo en las concentraciones *in vitro* de antibióticos, concentraciones a las cuales las bacterias planctónicas eran completamente susceptibles, [4,5]. En una revisión realizada por líderes de opinión sobre las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias incluidas en biofilm, se observó que la CIM no es adecuada para predecir el efecto de un antibiótico en estas infecciones [6]. En las directrices de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas de 2014 para el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones por biofilms, se establece que la susceptibilidad a los antibióticos mediante CIM no puede servir de guía para el tratamiento de los biofilm [7]. En su lugar, se han propuesto otras medidas de eficacia del antibiótico, como la concentración mínima de erradicación de biofilm (MBEC), la concentración bactericida mínima de biofilm (MBBC) o la concentración inhibitoria mínima de biofilm (MBIC). Se supone que éstos puedan ser 100-1000 veces superiores a la CIM, pero aún no se han establecido elementos de predicción fiable para el éxito del tratamiento.

Los mecanismos teóricos que impulsan el alto nivel de resistencia a los antibióticos en biofilm incluyen la exclusión mecánica de las moléculas de antibióticos por la matriz de polisacáridos y la presencia de organismos persistentes latentes dentro de la biopelícula. La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos es incierta, pero los datos que empezamos a disponer sugieren que los organismos persistentes constituyen hasta el 10% del biofilm. Debido al diferente fenotipo de estas bacterias, adaptado a las nuevas condiciones de vida, son capaces de evadir la acción antimicrobiana de una variedad de antibióticos convencionales que se basan en la interrupción de determinados procesos celulares. Post et al. mostraron que, aunque era posible erradicar el biofilm causado por *S. aureus*, la concentración de antibiótico necesaria prolongada en el tiempo no podía lograrse *in vivo* ni mediante administración sistémica ni por ningún procedimiento de administración local actualmente disponible [8]. Urish et al. concluyeron que la tolerancia era principalmente un fenómeno fenotípico, ya que el aumento de la ex-

posición a la cefazolina no daba como resultado cambios en la CIM [9]. En dos estudios, Antunes et al. identificaron que entre los aislamientos de especies de *Staphylococcus* habitantes del biofilm, el 89% se consideraron clínicamente resistentes a la vancomicina, incluso cuando los mismos microorganismos en situación planctónica presentaron valores de CIM que los clasificaron como completamente susceptibles a la vancomicina (CIM \leq 2 μ g/mL) [10, 11]. Los autores concluyeron que esta observación particular mostró "que la producción de biofilm produce una barrera importante para la difusión de antimicrobianos en el biofilm" y que "las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana basadas en valores de CIM por sí solas no pueden determinar con precisión la susceptibilidad exacta de las biopelículas bacterianas".

Ray et al. probaron *in vitro* ceftriaxona y gentamicina, ambos antibióticos de uso común en cirugía ortopédica, contra la biopelícula de *Serratia marcescens*, a dosis de 10, 100, 1,000 veces más que la CIM establecida para el aislado planctónico y encontraron que el antibiótico, incluso en estas concentraciones, no redujo la biomasa del biofilm [12].

Reiter et al. probaron *in vitro* rifampicina y vancomicina frente a aislamientos de *S. aureus* resistentes a metilicina en biofilm y planctónicos, y observaron un aumento de 32-32.000 veces en la resistencia a rifampicina y de 8-512 veces en la resistencia a vancomicina en aislamientos de biofilm [13]. Posteriormente, llegaron a la conclusión de que el antibiótico, utilizado a las concentraciones necesarias para los microbios planctónicos (la CIM), no podía erradicar el biofilm maduro.

Ruppen et al. probaron gentamicina como adyuvante de penicilina en un biofilm de estreptococo Grupo B *in vitro*, y encontraron un aumento de 2.000-4.000 veces en la resistencia a penicilina en presencia de biofilm y un aumento de 1-4 veces para gentamicina [14]. Los autores señalan que las dosis de gentamicina probadas no se correlacionaban con las concentraciones *in vivo* alcanzables sin efectos secundarios. Los autores concluyeron que la CIM no se correlacionaba con la susceptibilidad a las cepas de biofilm probadas.

Hajdu et al. probaron diversos antibióticos contra un biofilm de *S. epidermidis in vitro*. También se probaron las susceptibilidades de las mismas bacterias pero en forma planctónica con todos los antibióticos analizados en el estudio. En biofilm las susceptibilidades fueron hasta 128 veces mayores que las CIM. Solo la ceftriaxona mostró una reducción en la biomasa total de biofilm. No se produjo erradicación bacteriana con ningún antibiótico a ningún nivel por encima del CIM. También se constató que estos niveles eran mucho más altos que cualquier concentración clínica tolerable *in vivo* [15].

Ravn et al. estudiaron *in vitro* biofilms de infecciones de implantes por *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* y *Cutibacterium acnes* y encontraron susceptibilidades a antibióticos de 4 (para *Escherichia*

coli y ciprofloxacino) a 1.024 veces mayores que la CIM (para estafilococos, *Cutibacterium acnes* y vancomicina) [16]. Los autores concluyeron que utilizar concentraciones ajustadas según CIM puede no afectar en absoluto a las bacterias que viven en el biofilm.

Monzón *et al.* probaron la susceptibilidad de los biofilms de *S. epidermidis* a una variedad de antibióticos *in vitro*. Todas las bacterias en su forma platótica fueron completamente susceptibles a vancomicina. Los autores hallaron que la vancomicina, la teicoplanina, la clindamicina y el ofloxacino a dosis ajustadas según CIM tenían una tasa de muerte baja en la biopelícula madura de 24 horas. La rifampicina no se vio afectada por la presencia de biopelículas maduras y se mantuvo con una alta tasa de muerte cuando se ajustaba según CIM [17]. Los autores concluyeron que los antibióticos pueden perder su capacidad de destrucción en biopelículas maduras *in vivo*, a pesar de ser totalmente eficaces según la CIM.

Molina-Manso *et al.* probaron la susceptibilidad del biofilm de *Staphylococcus in vitro* y encontraron que ninguno de los antibióticos testados (rifampicina, vancomicina, clindamicina, cloxacilina, ciprofloxacino) podría erradicar las bacterias que viven en el biofilm, incluso en concentraciones muy por encima de las CIM calculadas para cada aislamiento individual [18].

Claessens *et al.* probaron en biofilm *in vitro* concentraciones de antibióticos hasta 40 veces superiores a la CIM calculada con aislamientos individuales de *S. epidermidis*. Encontraron que solo la rifampicina podía disminuir, pero no erradicar, la masa del biofilm, mientras que la vancomicina, teicoplanina y oxacilina no disminuyeron la masa del biofilm [19].

Dada la gran cantidad de evidencia detallada anteriormente, existe una clara necesidad de buscar enfoques alternativos para la prevención y el tratamiento de las infecciones relacionadas con el biofilm. El uso de sistemas locales de administración de antibióticos se considera ampliamente como un posible medio para alcanzar concentraciones de antibióticos suficientemente altas para superar la MBEC. Sin embargo, hay poca información sobre la duración óptima de MBEC que debe superarse para conseguir una curación. También existe la preocupación de que, aunque la elución temprana del antibiótico del cemento produce altas concentraciones locales de antibióticos, la concentración tardía con niveles sub-CIM puede promover el desarrollo de resistencia a los antibióticos, particularmente entre poblaciones bacterianas persistentes. Además, la MBEC puede cambiar con el tiempo de exposición a los antimicrobianos, lo que complica aún más los determinantes de la dosis local óptima y los sistemas portadores [20].

REFERENCIAS

- [1] Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:981-990. doi:10.1111/1469-0691.12651.
- [2] Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS, Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros.* 2012;11:461-479. doi:10.1016/j.jcf.2012.10.004.
- [3] Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:661-671.
- [4] Anwar H, Costerton JW. Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:1666-1671.
- [5] Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:2043-2046.
- [6] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:322-332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- [7] 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.
- [8] Post V, Wahl P, Richards RG, Moriarty TF. Vancomycin displays time-dependent eradication of mature *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Orthop Res.* 2017;35:381-388. doi:10.1002/jor.23291.
- [9] Urish KL, DeMuth PW, Kwan BW, Craft DW, Ma D, Haider H, et al. Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* Biofilm Persists on Arthroplasty Materials. *Clin Orthop Relat Res.* 2016;474:1649-1656. doi:10.1007/s11999-016-4720-8.
- [10] Antunes ALS, Bonfanti JW, Perez LRR, Pinto CCF, Freitas ALP de, Macedo AJ, et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:51-55.
- [11] Antunes ALS, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CCF, Perez LRR, Macedo AJ, et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS.* 2010;118:873-877. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02681.x.
- [12] Ray C, Shenoy AT, Orihuela CJ, González-Juarbe N. Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16:19. doi:10.1186/s12941-017-0192-2.
- [13] Reiter KC, Sambrano GE, Villa B, Paim TG da S, de Oliveira CF, d'Azevedo PA. Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45:471-474.
- [14] Ruppen C, Hemphill A, Sendi P. In vitro activity of gentamicin as an adjunct to penicillin against biofilm group B *Streptococcus*. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72:444-447. doi:10.1093/jac/dkw447.
- [15] Hajdu S, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E. Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Orthop Res.* 2009;27:1361-1365. doi:10.1002/jor.20902.
- [16] Ravn C, Furustrand T, Bétrisey B, Overgaard S, Trampuz A. Reduced ability to detect surface-related biofilm bacteria after antibiotic exposure under in vitro conditions. *Acta Orthop.* 2016;87:644-650. doi:10.1080/17453674.2016.1246795.
- [17] Monzón M, Oteiza C, Leiva J, Lamata M, Amorena B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;44:319-324.
- [18] Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrera E, Cordero-Ampuero J, et al. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:521-523. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.02.018.
- [19] Claessens J, Roriz M, Merckx R, Baatsen P, Van Mellaert L, Van Eldere J. Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:368-375. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.11.011.
- [20] Castaneda P, McLaren A, Tavaziva G, Overstreet D. Biofilm antimicrobial susceptibility increases with antimicrobial exposure time. *Clin Orthop Relat Res.* 2016;474:1659-1664. doi:10.1007/s11999-016-4700-z.



PREGUNTA 4: ¿Cuál es la concentración mínima de erradicación de biofilm (MBEC) de agentes antiinfecciosos?

RESPUESTA: El MBEC de los agentes antimicrobianos es una medida de la susceptibilidad a los antibióticos in vitro de los organismos infecciosos productores de biopelículas. Depende de la superficie, el medio y el período de exposición a un agente antimicrobiano. No hay parámetros de medición estandarizados para MBEC. MBEC es actualmente un valor de laboratorio de investigación y carece de aplicabilidad clínica. En opinión del grupo, sería muy deseable el desarrollo de un ensayo MBEC validado clínicamente.

NIVEL DE EVIDENCIA: Consenso

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%, en desacuerdo: 0%, abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte)

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Una consulta de Medline sobre el ítem "concentración mínima de erradicación de biofilm" recuperó 149 referencias. En su mayor parte, estas referencias se refieren a bacterias con poca o sin participación en infecciones de dispositivos ortopédicos. Una consulta sobre "concentración mínima de erradicación del biofilm de agentes infecciosos" obtuvo 18 referencias; ninguna de ellas estaba claramente relacionada con la infección ósea ni de biomateriales de uso ortopédico. La búsqueda en Medline "concentración mínima de erradicación de biofilm e infección asociada a implante" recupera solo tres referencias [1-3].

El trabajo de Coraça-Huber *et al.* [1] se enfoca en la evaluación de un modelo de concentración mínima de bacterias (MBC) en infecciones de biomaterial, utilizando cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. La formación de biofilm se hace con el sistema MBEC-HTP (placas de alto rendimiento) de Innovotech, Inc. (Edmonton, Alberta, Canadá), y está documentada mediante microscopía electrónica. La comparación de CIM y MBEC se realizó para daptomicina, gentamicina, vancomicina, rifampicina, fosfomicina, clindamicina y linezolid. Las biopelículas generadas por *S. epidermidis* muestran menos resistencia a los antibióticos que las generadas por *S. aureus*. El MBEC es mucho más alto que la CIM para todos los antibióticos. La daptomicina y la rifampicina son los antibióticos más efectivos contra *S. aureus* en biofilm, pero no obtienen su erradicación completa.

Brady *et al.* [2] plantearon la validez de la MBEC para reemplazar el IJC. Se estudiaron veinte aislamientos de estafilococos en infecciones por catéter (17 SCN, 3 SASM) y se probaron diez antibióticos (penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, fucidine, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, teicoplanina y ciprofloxacino). La cuantificación de la formación de biofilm en placas de microtitulación y *Tryptic Soy Broth* (TSB) se obtiene por el método del cristal violeta. La detección del mecanismo de formación de biofilm (proteína o polisacárido) se obtiene por tratamiento de metaperiodato de sodio y placas de proteína quinasa. La búsqueda del operón ica (código en estafilococos para la producción de enzimas necesarias para la adhesión) se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Dieciséis de las 20 cepas (80%) probadas producen biofilm; esta producción de biofilm es baja en 8 de las cepas, moderada en 2 y alta en las 6 restantes, siendo todas ellas portadoras de operones ica. La MBEC fue de 10 a 1,000 veces más alta que la CIM para las bacterias productoras de biopelículas. En la práctica, el MBC es $> 256 \mu\text{g/ml}$ para todas las cepas estudiadas, ya sea que se demuestre o no la producción de biofilm por las técnicas utilizadas, lo que plantea la cuestión de las cepas que forman un biofilm de proteínas que no pueden ser cuantificadas por el método del cristal violeta.

Zaborowska *et al.* [3] analizaron la sensibilidad de estafilococos y enterococos de acuerdo con su producción de biofilm. Las 13 cepas estudiadas se aislaron de infecciones en material de anclaje óseo

percutáneo y en muñones de amputación femoral para el ajuste protésico. Estos casos, por tanto, implican una protrusión permanente de un implante de titanio a través de la piel, lo cual supone un punto de entrada potencial para las bacterias de la flora cutánea y fecal. Las bacterias se obtuvieron de muestras de hueso y de biomaterial de 11 pacientes. Se trata de cuatro cepas de *S. aureus*, tres cepas de estafilococos coagulasa negativos y seis cepas de *Enterococcus faecalis*. Se analizaron MIC y MBEC de diez antibióticos (clindamicina, gentamicina, vancomicina, linezolid, ciprofloxacino, oxacilina, ácido fúcido, ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y rifampicina). El cultivo en placa de microtitulación en TSB se utilizó para evaluar la capacidad de producción de biofilm. La masa total del biofilm formado se midió con la técnica de cristal violeta, calificándolo como ausente, baja, moderada, o alta producción. La formación de exopolisacáridos (limo) se analizó mediante la técnica del rojo Congo. La búsqueda del operón ica para estafilococos se obtuvo mediante PCR. La determinación de la MBEC se realizó mediante el dispositivo *Calgary Biofilm* (CBD). Once de las 13 cepas estudiadas producen biofilm, pero la cantidad de biofilm es heterogénea según las especies bacterianas. El MBEC es significativamente más alto que la CIM para los 10 antibióticos estudiados. La relación MBEC/MIC es variable con marcadas diferencias entre las especies bacterianas. La MBEC es alta y homogénea para todas las cepas de *Enterococcus faecalis*: MBEC/MIC de 64 a 2048, mediana 512, para vancomicina, ciprofloxacino, linezolid, ampicilina y rifampicina. En comparación, las cepas de *Staphylococcus* muestran una variabilidad significativa entre cepas; para *S. aureus* la MBEC/MIC varía de 1 a 2.048, mediana 9, para los 10 antibióticos probados. Para *S. epidermidis* la relación varía de 0,0038 a 64, mediana 1. El operón ica se aísla para todos los estafilococos; sin embargo, dos cepas no producen limo al aplicar el rojo Congo, lo cual demuestra la variabilidad en la expresión génica. Para estas dos cepas, la cantidad de biofilm evaluado por el cristal violeta fue muy abundante, lo que indica que este biofilm consistió principalmente en células agregadas sin producción de limo.

El seguimiento clínico de los 11 pacientes se correlacionó con los resultados expresados en MBEC. El fracaso se correlacionó con un alto valor de MBEC, pero no se alcanzó significación estadística. Dos pacientes no presentaron ninguna complicación (recurrencia, reinfección, necesidad de retirada del material); en uno de ellos la cepa no produjo biofilm, mientras que en el otro la producción fue baja. En el caso de otras cepas con baja a moderada producción de biofilm, los pacientes experimentaron una o dos complicaciones. Un paciente desarrolló las tres complicaciones (recurrencia, reinfección y necesidad de retirada del material), y su cepa producía mucho biofilm. Al igual que en los otros dos estudios, el trabajo presentado aquí solo prueba los antibióticos como monoterapia, mientras que

en la práctica clínica habitual es frecuente la terapia combinada, particularmente cuando se prescribe rifampicina.

El trabajo de Saginur *et al.* [4] analiza 17 cepas de *S. epidermidis*, 11 cepas de *S. aureus* susceptibles a meticilina (SASM) y 12 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), aisladas de infecciones en material, calculando MIC y MBEC (dispositivo CBD) de 9 antibióticos en monoterapia y 94 combinaciones de antibióticos en biterapia o triterapia. La MBEC es significativamente más alta que la CIM, pero también se encuentra una heterogeneidad significativa entre las cepas en la monoterapia. Entre las 94 combinaciones de antibióticos probadas, 11 son bactericidas en más del 90% de las cepas de SASM que crecen en biofilm y 9 son para *S. epidermidis*. La rifampicina es el antibiótico más presente en estas combinaciones.

La eficacia de los antibióticos contra las bacterias que crecen en una biopelícula generalmente se explora *in vitro* bajo condiciones estandarizadas y breves de exposición de la cepa bacteriana al antibiótico analizado. En la práctica clínica, la exposición a antibióticos es prolongada [5]. En este trabajo, las cepas bacterianas (SASM, SARM, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) se analizan para detectar el crecimiento en una biopelícula a concentraciones variables de antibióticos durante tres períodos de exposición a antibióticos de uno, tres y cinco días. Para la mayoría de las cepas y antibióticos probados, la MBEC es significativamente más baja después de 5 días de exposición a los antibióticos que la medida después de 24 horas de exposición. La medición de la actividad antibiótica *in vitro* por la CIM determinada en bacterias planctónicas no es predictiva de la actividad antibiótica *in vivo* en bacterias que crecen en una biopelícula. El MBEC es el parámetro supuestamente más apropiado para predecir la eficacia de los antibióticos *in vivo*. La revisión de la literatura muestra que este parámetro se ha estudiado cada vez más en los últimos años y se tiene en cuenta para probar los antibióticos o varias moléculas contra múltiples microorganismos.

Si bien el método de determinación de MBEC *in vitro* no es problemático, la medición de la producción de biofilm es más aleatoria. La biopelícula está formada por células bacterianas y una matriz extracelular de polisacáridos (limo) y/o proteínas. No todas las bacterias producen biopelículas. Para los estafilococos, la producción de biofilm está vinculada a la existencia de un operón (ica), detectable por PCR pero cuya expresión es variable, y el resultado positivo del operón no significa producción de limo. La medición de la masa total de biofilm, generalmente mediante la técnica de cristal violeta, que potencialmente define las cantidades de biofilm formado (ausente, débil, moderada, fuerte), no necesariamente tiene en cuenta la composición de esta biofilm, que probablemente modifique la MBC de los antibióticos.

La capacidad de producir biofilm es heterogénea en función de la especie bacteriana. De acuerdo con los datos disponibles, la capacidad para producir biofilm es grande en los *Enterococcus faecalis* sin variabilidad entre cepas. Para los estafilococos, la capacidad de producir biofilm parece más marcada en *S. aureus* que en *S. epidermidis*, pero la variabilidad entre cepas es importante. La rifampicina parece ser un antibiótico más activo en biofilm que el promedio. Sin embargo, esto no es una regla absoluta. La eficacia de las combinaciones de antibióticos es significativamente superior a la de las moléculas en monoterapia.

En una situación clínica concreta, para una cepa dada, la MBEC no puede estimarse a priori, al menos para los estafilococos. De los pocos datos publicados, el MBEC parece al menos 64 veces más alto que el MIC para los antibióticos activos contra *Enterococcus faecalis* (ampicilina, vancomicina, linezolid, rifampicina). Para otras bacterias, el MBEC de los antibióticos activos no se conoce.

No existe una combinación de antibióticos que garantice la erradicación de bacterias en la biopelícula de estafilococos, aunque las combinaciones de antibióticos son generalmente más efectivas que los tratamientos en monoterapia. La medición *in vitro* de la MBEC no es una técnica rutinaria por el momento. El campo de investigación necesita definir una metodología estandarizada para su posible uso en la práctica clínica. La alta producción de biofilm se correlaciona con una mayor complicación o tasa de fracaso que la baja o nula producción de biofilm, pero sin una demostración estadística por el momento.

REFERENCIAS

- [1] Coraça-Hubér DC, Fille M, Hausdorfer J, Pfaller K, Nogler M. Evaluation of MBECTM HTP biofilm model for studies of implant associated infections. *J Orthop Research*. 2012;30:1176–1180. doi:10.1002/jor.22065.
- [2] Brady AJ, Lavery G, Gilpin DF, Kearney P, Tunney M. Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *J Med Microbiol*. 2017;66:461–469. doi:10.1099/jmm.0.000466.
- [3] Zaborowska M, Tillander J, Brånemark R, Hagberg L, Thomsen P, Trobos M. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococci and enterococci from osteomyelitis associated with percutaneous orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105:2630–2640. doi:10.1002/jbm.b.33803.
- [4] Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, Lee C, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant associated infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:55–61. doi:10.1128/AAC.50.1.55-61.2006.
- [5] Castaneda P, McLaren A, Tavaziva G, Overstreet D. Biofilm antimicrobial susceptibility increases with antimicrobial exposure time. *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474:1659–1664. doi:10.1007/s11999-016-4700-z.



Autores: Tristan Ferry, Antonio Pellegrini, Sébastien Lustig, Frédéric Laurent, Gilles Leboucher, Claudio Legnani, Vittorio Macchi, Silvia Gianola

PREGUNTA 5: ¿Los bacteriófagos tienen un papel en el tratamiento de la infección articular periprotésica (IAP) resistente a múltiples fármacos?

RESPUESTA: Desconocido. Aunque algunos estudios preclínicos y clínicos han demostrado un buen perfil de seguridad, así como prometedores efectos terapéuticos, cuando se utilizan bacteriófagos para el tratamiento de infecciones óseas y articulares, se requiere investigación clínica adicional sobre el uso de terapia con bacteriófagos en pacientes con IAP resistente a múltiples fármacos.

Se conocen obstáculos para la terapia con bacteriófagos, incluido el hecho de que los bacteriófagos se neutralizan en el suero y los patógenos relevantes contienen inmunidad mediada por "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - associated protein-9 nuclease" (CRISPR/cas9) contra el bacteriófago. Los fagos son usualmente específicos de cada cepa bacteriana; por lo tanto, un cóctel de diferentes linajes de bacteriófagos podría ser necesario para tratar eficazmente las infecciones mediadas por biofilm

NIVEL DE EVIDENCIA: Consenso

VOTO DEL DELEGADO: De acuerdo: 100%, en desacuerdo: 0%, abstención: 0% (consenso unánime y más fuerte)

JUSTIFICACIÓN PREVIA A LA REUNIÓN

Las IAPs representan problemas graves para los pacientes de todo el mundo. Se ha informado que todas las superficies de los implantes ortopédicos son susceptibles a la colonización por bacterias formadoras de biofilm, como *S. aureus* resistente a, *P. aeruginosa* y muchos otros organismos, lo que conlleva la resistencia a los antibióticos [1-4]. Para superar estos problemas, se están desarrollando nuevas estrategias de tratamiento que se centran en la interrupción de las biopelículas [5]. La utilización de bacteriófagos líticos para erradicar las bacterias que causan las biopelículas es una de las tecnologías emergentes prometedoras [3,6].

Los bacteriófagos son virus naturales que infectan las bacterias, y son uno de los organismos más abundantes en la biosfera. Cada bacteriófago es específico de una especie microbiana particular. Como todos los virus, los fagos solo pueden replicarse dentro de sus células hospedadoras. Los fagos líticos inyectan su material genético en la célula bacteriana del huésped, se multiplican, y finalmente causan la lisis de las células bacterianas, lo cual libera nuevos fagos que continúan el ciclo: infección sucesiva de bacterias adicionales en un patrón rápido y exponencial, facilitando la erradicación completa de las bacterias. El microbiólogo francés Félix d'Herelle describió por primera vez los bacteriófagos en 1917 [7]. Por su naturaleza, los bacteriófagos son buenos candidatos para la terapia antibacteriana. De hecho, se dirigen específicamente a una bacteria, siempre que esté presente la bacteria huésped correspondiente. En comparación con los antibióticos, este fenómeno es único, ya que es exponencial y autosostenido después de una o varias administraciones. Además, los bacteriófagos líticos no afectan a las células eucariotas y no afectan la microbiota intestinal cuando se administran localmente.

La tecnología de bacteriófagos es particularmente prometedora en pacientes con IAP multirresistente, ya que: (i) las IAP multiresistentes son cada vez más frecuentes [8,9]; (ii) la tasa de recaída es particularmente alta en pacientes con IAP causada por un patógeno resistente a múltiples fármacos [9-11]; (iii) los bacteriófagos y los antibióticos son sinérgicos [12,13]; (iv) no hay resistencia cruzada entre la resistencia a los antibióticos y la resistencia a los bacteriófagos [6-12]; (v) algunos modelos *in vitro* y en animales demostraron que los bacteriófagos podrían tener una actividad antibacteriana [6,13,14]; y (vi) los ensayos recientes en humanos y animales que utilizan la terapia con fagos no han mostrado toxicidad tisular local ni efectos adversos para el huésped [15-20].

Los bacteriófagos se utilizaron en la década de 1970 en Francia [21] y continuaron siendo un tratamiento popular durante todo el siglo XX en Europa Oriental (Polonia) y en la antigua Unión Soviética

(Georgia, Rusia) en pacientes con osteomielitis recurrente. Se han publicado pocas series de casos en la literatura, incluidos pacientes con infección piógena articular nativa, osteomielitis crónica, supuración después de una fractura ósea y osteomielitis del pie diabético [22-26]. En estudios preclínicos que utilizaron modelos animales con bacteriófagos para IAP se encontró que previenen la adhesión bacteriana y también interrumpen la formación de biofilm [13,27]. Los estudios en animales también han demostrado sinergismo entre los antibióticos y los bacteriófagos [13]. En otro estudio en animales, Kishor *et al.* [26] estudiaron la eficacia de varios fagos utilizados conjuntamente como una modalidad de tratamiento para la osteomielitis crónica causada por SARM en conejos. El estudio demostró que la combinación de fagos específicos seleccionados en función de su virulencia contra diversas cepas de SARM clínicos fue efectiva para erradicar la infección, lo que sugiere que un "cóctel hecho a medida" de fagos solo puede ser efectivo para atacar bacterias específicas en el asentamiento de una infección crónica. Algunos de los problemas con los modelos animales actuales de IAP son que no replican las tensiones mecánicas que ocurren en los entornos clínicos y, por lo tanto, pueden no ser totalmente representativas de las situaciones clínicas.

Wright *et al.* realizaron un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego con bacteriófagos en humanos [28]. Estudiaron el efecto del cóctel de combinación de seis fagos dirigidos contra *P. aeruginosa* en el tratamiento de la infección por otitis media crónica resistente a los antibióticos. Los autores lograron efectos terapéuticos medibles con una dosis mínima, lo que sugiere un papel prometedor para la terapia con fagos en el tratamiento de infecciones resistentes a los antibióticos.

No se han publicado series de casos que incluyan pacientes con IAP (solo se recuperaron dos casos de una serie francesa de infección osteoarticular tratada con bacteriófagos) [6]. En la práctica georgiana, se utilizan mezclas específicas de fagos, como el cóctel "pyophage" que contiene fagos contra *S. aureus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *P. aeruginosa* y *Escherichia coli* (*E. coli*) o bacteriófagos específicos dirigidos específicamente a estafilococos, como el fago Sb-1 (que podría importarse en los EE. UU.), el bacteriófago K o el bacteriófago ISP [22]. En Polonia, los fagos se seleccionan de un banco en función de su actividad sobre la cepa del paciente para adaptar el tratamiento (medicina personal) y para asegurar la actividad antibacteriana de los fagos utilizados [23,24]. Todos estos bacteriófagos se preparan clásicamente con un inóculo bacteriano, la infección *in vitro* con el bacteriófago y la purificación de la preparación en alícuotas de 10⁷ a 10⁸ UFP/ml. Estas preparaciones están aprobadas por las autoridades locales, pero no respetan los estándares europeos de "buenas

prácticas de fabricación" (GMP) para realizar ensayos clínicos y obtener Autorizaciones de Mercado (MA). De hecho, el producto final requiere la eliminación total de los componentes bacterianos para limitar la pirogenicidad y los eventos adversos que pueden surgir durante la administración/uso del fago, especialmente cuando el fago se administra por vía intravenosa o directamente en una cavidad articular. Como consecuencia, actualmente los bacteriófagos no se inyectan directamente en la articulación en pacientes con IAP, sino localmente a través de la fistula y/o por vía oral en pacientes con osteomielitis crónica [23-25].

Recientemente, se ha realizado un ensayo clínico multicéntrico europeo. Evalúa la terapia con fagos en infecciones de quemaduras por *P. aeruginosa* y bacteriófagos de *E. coli* a partir de un proceso de bioproducción francesa de GMP que se implementó de acuerdo con los estándares de la Agencia Europea de Medicina (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT02116010). El equipo francés del Grupo de Estudio de Infección Osteoarticular de Lyon (BJI) (también llamado CRIoAc Lyon, centro de referencia regional para el tratamiento de infecciones complejas osteoarticulares en Francia; <http://www.crioac-lyon.fr>) ha utilizado como terapia de rescate, bajo la supervisión de las autoridades sanitarias francesas, en tres pacientes con infección crónica osteoarticular (una osteomielitis debida a *P. aeruginosa* ampliamente resistente a antibióticos y dos IAPs por *S. aureus*) bacteriófagos que siguen el mismo proceso de producción. Para todos los pacientes, el cóctel fue personalizado y seleccionado en función de la susceptibilidad bacteriófaga de los aislamientos clínicos (fagograma, que se basa en un principio similar al antibiograma pero con bacteriófagos) (obtenidos por punción articular antes de la cirugía). Los dos pacientes con IAP tenían una infección crónica con secreción purulenta y fueron tratados con antibióticos, desbridamiento y retención de implantes (DAIR), suplementados con una administración directa del cocktail bacteriófago para *S. aureus* en la cavidad articular al final del procedimiento. A ambos pacientes les está yendo bien durante el seguimiento de 12 meses y 3 meses, respectivamente (datos no publicados).

Un ensayo clínico aleatorizado llamado PHAGOS comenzará pronto en Francia para evaluar la adición del bacteriófago contra *S. aureus* en pacientes con IAP recurrente. La disponibilidad de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* con GMP estándar en Francia es una gran oportunidad para evaluar la terapia con fagos como un tratamiento aditivo en pacientes con IAP, especialmente en pacientes con IAP resistente a múltiples fármacos. Aunque el tratamiento con fagos parece prometedora y seguro, se necesita más investigación para comprender la inmunogenicidad y responder a las preguntas restantes relacionadas con este tratamiento tan distinto, tales como momento de administración, duración, métodos de administración y vía de administración.

Las limitaciones de los estudios actuales incluyen el espectro reducido de bacterias analizadas, que se limitan a SARM y *P. aeruginosa*, sin considerar estafilococos coagulasa negativos (CoNS), que contribuyen sustancialmente a la aparición de IAP [29]. Además, existe una preocupación con respecto a la inmunogenicidad de los fagos y la disminución de la eficacia terapéutica [30].

REFERENCIAS

- Urish KL, DeMuth PW, Kwan BW, Craft DW, Ma D, Haider H, et al. Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* biofilm persists on arthroplasty materials. *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474:1649-1656. doi:10.1007/s11999-016-4720-8.
- Ma D, Shanks RMQ, Davis CM, Craft DW, Wood TK, Hamlin BR, et al. Viable bacteria persist on antibiotic spacers following two-stage revision for periprosthetic joint infection. *J Orthop Res*. 2017;36:452-458. doi:10.1002/jor.23611.
- Tzeng A, Tzeng TH, Vasdev S, Korth K, Healey T, Parvizi J, et al. Treating periprosthetic joint infections as biofilms: key diagnosis and management strategies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:192-200. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.018.
- Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop*. 2015;86:147-158. doi:10.3109/17453674.2014.966290.
- George DA, Gant V, Haddad FS. The management of periprosthetic infections in the future. *Bone Joint J*. 2015;97-B:1162-1169. doi:10.1302/0301-620X.97B9.35295.
- Akanda ZZ, Taha M, Abdelbary H. Current review-The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. *J Orthop Res*. 2018;36(4):1051-1060. doi:10.1002/jor.23755.
- Clokier MR, Millard AD, Letarov A V, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011;1:31-45. doi:10.4161/bact.1.1.14942.
- Drago L, De Vecchi E, Bortolin M, Zagra L, Romanò CL, Cappelletti L. Epidemiology and antibiotic resistance of late prosthetic knee and hip infections. *J Arthroplasty*. 2017;32:2496-2500. doi:10.1016/j.arth.2017.03.005.
- Ribera A, Benavent E, Lora-Tamayo J, Tubau F, Pedrero S, Cabo X, et al. Osteoarticular infection caused by MDR *Pseudomonas aeruginosa*: the benefits of combination therapy with colistin plus β -lactams. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(12):3357-3365. doi:10.1093/jac/ckv281.
- Rodríguez-Pardo D, Pigrau C, Lora-Tamayo J, Soriano A, del Toro MD, Cobo J, et al. Gram-negative prosthetic joint infection: outcome of a debridement, antibiotics and implant retention approach. A large multicenter study. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:0911-0919. doi:10.1111/1469-0691.12649.
- Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis*. 2013;56:182-194. doi:10.1093/cid/cis746.
- Oechslin F, Piccardi P, Mancini S, Gabard J, Moreillon P, Entenza JM, et al. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *J Infect Dis*. 2017;215:703-712. doi:10.1093/infdis/jiw632.
- Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95:117-125. doi:10.2106/JBJS.K.01135.
- Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo J-S, Carli A, et al. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Front Microbiol*. 2018;9:127. doi:10.3389/fmicb.2018.00127.
- Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care*. 2009;18:237-243. doi:10.12968/jowc.2009.18.6.42801.
- Rose T, Verbeke G, Vos D De, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Lavigne R, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int J Burns Trauma*. 2014;4:66-73.
- Donlan RM. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol*. 2009;17:66-72. doi:10.1016/j.tim.2008.11.002.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:649-659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
- Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2874-2878. doi:10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005.
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1:66-85. doi:10.4161/bact.1.2.15845.
- Lang G, Kehr P, Mathevon H, Clavert JM, Séjourné P, Pointu J. [Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery (author's transl)]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1979;65:33-37.
- Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology* 2010;28:591-5. doi:10.1016/j.tibtech.2010.08.001.
- Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch Immunol Ther Exp*. 1987;35:569-583.
- Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, et al. Clinical Aspects of Phage Therapy. *Adv Virus Res*. 2012;83:73-121. doi:10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7.
- Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *J Wound Care*. 2016;25:527-533. doi:10.12968/jowc.2016.25.7.S27.
- Kishor C, Mishra R, Saraf S, Kumar M, Srivastava A, Nath G. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Indian J Med Res*. 2016;143:87. doi:10.4103/0971-5916.178615.
- Kaur S, Harjai K, Chhibber S. In vivo assessment of phage and linezolid based implant coatings for treatment of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) mediated orthopaedic device related infections. *PLoS One*. 2016;11:e0157626. doi:10.1371/journal.pone.0157626.
- Wright A, Hawkins CH, Ånggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009;34:349-357. doi:10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x.
- Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:302-345. doi:10.1128/CMR.00111-13.
- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*. 2002;70:204-210.