

PCR panbacteriana en tiempo real para evaluar la carga bacteriana en heridas crónicas tratadas con Cutimed™ Sorbact™

V. Gentili · S. Giancesini · P. G. Balboni · E. Menegatti ·
A. Rotola · M. Zuolo · E. Caselli · P. Zamboni ·
D. Di Luca

Recibido: 24 de junio de 2011 / Aceptado: 19 de octubre de 2011 / Publicado en línea: 19 de noviembre de 2011

© Los autores 2011. Este artículo se publica en acceso abierto en Springerlink.com

Resumen El impacto de la infección bacteriana polimicrobiana en las heridas crónicas se ha estudiado ampliamente, pero el análisis bacteriológico estándar no siempre es lo suficientemente sensible. Los enfoques moleculares representan una alternativa prometedora al análisis bacteriológico estándar. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real panbacteriana para cuantificar la carga bacteriana total en heridas crónicas tratadas con Cutimed™ Sorbact™, un novedoso enfoque terapéutico basado en la unión hidrofóbica de las bacterias a una membrana. Los resultados obtenidos mediante PCR panbacteriana en tiempo real sobre secuencias conservadas del gen 16S bacteriano muestran que la carga bacteriana disminuyó significativamente en 10 de las 15 heridas crónicas en proceso de cicatrización, y no varió en 5 de las 5 heridas crónicas que no cicatrizaban. Por el contrario, el cultivo clásico para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y la PCR en tiempo real para *Bacteroides* y *Fusobacterium* no mostraron ninguna correlación con el resultado clínico. Nuestro estudio también muestra que la cuantificación de las heridas crónicas mediante PCR en tiempo real panbacteriana debe realizarse en biopsias y no en frotis. Estos resultados muestran que la PCR en tiempo real panbacteriana es un método prometedor y rápido para determinar la carga bacteriana total en heridas crónicas, y sugieren que podría ser un biomarcador importante para el pronóstico de las heridas crónicas en tratamiento.

Introducción

Las heridas crónicas tienen la importante característica de que su tiempo de cicatrización no es predecible y pueden no llegar a curarse nunca, lo que causa un grave estrés físico y emocional a los pacientes. Las principales consecuencias son la discapacidad y la disminución de la calidad de vida, pero también un impacto financiero significativo en el sistema sanitario, los pacientes y sus familias.

Las heridas crónicas están colonizadas por una flora polimicrobiana [1, 2], compuesta por bacterias comensales, como estafilococos, estreptococos, *Pseudomonas* spp. y bacterias coliformes. También proliferan bacterias anaeróbicas en la herida, debido a la combinación de tejido necrótico y baja tensión de oxígeno [3]. El papel de las bacterias en las heridas depende de su concentración, la composición de las especies y la respuesta del huésped [4, 5]. La contaminación y la colonización por bajas concentraciones de microbios se consideran normales y no se cree que inhiban la cicatrización [6]. Sin embargo, la colonización crítica y la infección se asocian con un retraso significativo en la cicatrización de la herida [7].

La microbiología clínica se ha centrado en determinar las concentraciones y la identidad de los microbios asociados a la infección de las heridas. El análisis de frotis o de tejido de desbridamiento de heridas crónicas, llevado a cabo mediante aislamiento en agar y caracterización bioquímica, presenta varias deficiencias. De hecho, los métodos de cultivo detectan solo alrededor del 1 % de todas las bacterias presentes en las heridas crónicas [8], y no es posible

aislar todas las especies bacterianas presentes en una herida específica.

Recientemente, varios informes han reforzado la idea de que la naturaleza polimicrobiana de la infección y las interacciones aún indeterminadas entre las bacterias colonizadoras pueden desempeñar un papel importante en la falta de cicatrización de las heridas crónicas [9, 10]. Por lo tanto, la determinación de la carga bacteriana podría ser un parámetro de laboratorio importante. Existe una percepción cada vez mayor de que la presencia de 10^5 o más

V. Gentili · P. G. Balboni · A. Rotola · E. Caselli · D. Di Luca (✉)
Departamento de Medicina Experimental y Diagnóstica, Universidad de
Ferrara,
Via Borsari 46,
44121 Ferrara, Italia.
Correo electrónico:
ddl@unife.it

S. Giancesini · E. Menegatti · M. Zuolo · P. Zamboni Centro
de Enfermedades Vasculares, Universidad de Ferrara, Ferrara,
Italia

de células bacterianas por gramo de tejido (determinada mediante análisis clásicos basados en cultivos) es un factor determinante clave en el retraso de la cicatrización de las heridas. Sin embargo, los métodos de cultivo cuantitativos tienen limitaciones a la hora de definir un valor umbral de carga bacteriana significativa. De hecho, dependen de las condiciones de crecimiento *in vitro* y solo detectan bacterias viables y cultivables. Para evaluar la importancia de la carga bacteriana en la cicatrización de las heridas es necesario cuantificar toda la gama de gérmenes presentes en una herida. Los métodos moleculares son una alternativa atractiva para determinar la carga bacteriana, ya que pueden identificar incluso los microorganismos no cultivables [10, 11].

La PCR en tiempo real, que permite cuantificar con precisión la carga bacteriana, se ha utilizado para detectar y cuantificar patógenos específicos en heridas crónicas [12, 13], pero requiere el uso de reactivos específicos para cada especie bacteriana de interés. Un avance importante de la PCR en tiempo real ha sido el diseño de cebadores «universales», centrados en el gen del ARN ribosómico 16S [14, 15], una región altamente conservada entre todas las bacterias. Este enfoque determina la carga bacteriana total con alta sensibilidad, resultados rápidos y detección de todas las bacterias, tanto aeróbicas como anaeróbicas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la PCR en tiempo real panbacteriana para determinar la carga bacteriana en heridas crónicas. El análisis se llevó a cabo en el marco de un estudio clínico piloto no comparativo diseñado para evaluar la eficacia de Cutimed™ Sorbact™ (BSN Medical, Hamburgo, Alemania), un innovador apósito antimicrobiano para el tratamiento de heridas crónicas. Las fibras de Cutimed™ Sorbact™ están recubiertas con un ácido graso hidrófobo que se une de forma irreversible a la superficie bacteriana y elimina mecánicamente las bacterias de la herida en cada cambio de apósito [16–18] (www.cutimeduk.com/cutimed-sorbact.html). Este mecanismo de acción puede prevenir o reducir el tratamiento con antibióticos, evitando varios inconvenientes de los fármacos, como la resistencia a los antibióticos [19, 20].

Materiales y métodos

Estudio clínico

El Centro de Enfermedades Vasculares (Hospital St. Anna, Ferrara) llevó a cabo un estudio piloto no comparativo, doble ciego. Se obtuvo la aprobación ética del Comité de Ética de la Universidad de Ferrara.

Diecinueve pacientes consecutivos (con un total de 20 heridas) afectados por úlceras crónicas arteriales o venosas en las piernas fueron incluidos en el estudio y dieron su consentimiento informado por escrito. Los criterios de exclusión fueron: desnutrición, tratamiento antibiótico sistémico hasta 2 semanas antes del inicio del estudio, inmunosupresión y tratamiento con cortisona.

Las úlceras se trataron con un lavado con solución salina de NaCl al 0,9 %, desbridamiento quirúrgico y aplicación de Cutimed™ Sorbact™ (BSN Medical, Hamburgo, Alemania). Los apósitos se cambiaron dos veces por semana y el estudio se llevó a cabo durante un periodo de 4 semanas. Durante los cambios de apósito, las úlceras se lavaron con solución salina y, cuando fue necesario, se utilizaron espumas PU, cubiertas secundarias y elasto-compresión de referencia. La documentación de los casos se realizó utilizando un sistema estándar de documentación de heridas y formularios especiales de informe de casos individuales, incluyendo una evaluación del estado de las heridas (tamaño de la herida, extensión de la necrosis, tejido de granulación, fibrina y epitelización, dolor) y la calidad de vida. La calidad de vida se evaluó mediante el cuestionario SF36, un conjunto estandarizado de preguntas sobre las condiciones generales de vida respondidas por el paciente en una escala de 0, que representa la peor condición, a 100, la mejor condición.

Se tomaron fotografías de la herida una vez a la semana. Todas las muestras se transportaron al laboratorio bajo código para garantizar la privacidad de los pacientes.

Muestreo de la herida

Se realizaron biopsias con sacabocados al inicio y al final del tratamiento con Cutimed™ Sorbact™. Se tomaron hisopos una vez a la semana durante el cambio de apósito. Las muestras de tejido, obtenidas de forma aséptica y colocadas en un tubo estéril que contenía 500 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril, se transportaron al laboratorio, donde se pesaron, homogeneizaron y lisaron.

Se realizaron frotis de la herida utilizando el apósito Cutimed™ Sorbact™ para recoger líquido superficial de la herida y restos de tejido. Los apósitos se colocaron en un tubo estéril que contenía 2 ml de PBS estéril y se transportaron al laboratorio. Se utilizaron frotis cutáneos de seis donantes sanos como controles.

Extracción de ADN

Las muestras de biopsia y hisopos se incubaron en 2 ml y 3 ml de tampón de lisis (0,6 % de SDS, 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 120 µg/ml de proteinasa K) a 37 °C durante toda la noche.

El ADN genómico se extrajo mediante cuatro tratamientos con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Tras la precipitación con isopropanol, el ADN se centrifugó, se lavó con etanol al 75 % y se resuspendió en 100 µL de agua estéril. La concentración de ADN se evaluó midiendo la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro y realizando una segunda lectura con el fluorímetro Qubit (Invitrogen), evitando así lecturas erróneas debidas a la presencia de ARN o proteínas.

El ADN purificado se almacenó a –20 °C hasta el análisis por PCR en tiempo real.

Cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, EE. UU.), incluyendo *E. coli* (ATCC 10536), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *E. hirae* (ATCC 541), *S. agalactiae* (ATCC 12344), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) y *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 25286). Las bacterias anaeróbicas se cultivaron en agar CDC Anaerobe con placas de sangre de oveja al 5 % y en medio BBL Cooked Meat (Becton–Dickinson). Las condiciones anaeróbicas se crearon utilizando el sobre AnaeroGen en el frasco anaeróbico (Oxoid) y se evaluaron mediante el indicador anaeróbico.

PCR en tiempo real

Se utilizó la PCR cuantitativa en tiempo real para determinar tanto la cantidad de genomas bacterianos totales con un conjunto de cebadores y sonda de consenso panbacteriano, como la cantidad de genomas de *Bacteroides* y *Fusobacterium* mediante reacciones específicas.

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el equipo de PCR 7300 de Applied Biosystems. Los cebadores, las sondas y las condiciones de reacción para la qPCR panbacteriana fueron los descritos anteriormente por Yang et al. [21], salvo por la modificación del colorante reportero. Los conjuntos de cebadores y sondas para la PCR en tiempo real de *Bacteroides* y *Fusobacterium* se diseñaron a partir de secuencias depositadas en GenBank (números de acceso CR626927 y FJ410389, respectivamente). Los cebadores para *Fusobacterium* fueron: (directo) 5'-CCGCGCATTCCGTATGG -3', (inverso) 5'-CGGGTAGGATCAGCCTGTTATC-3' y la sonda fue 5'-(6Fam)TCGTCGCTCAACGGATAAAAAGCTACCCT (Tamra)-3'.

Los cebadores para *Bacteroides* fueron: (directo) 5'-TTCAGGC TAGCGCCATT-3', (inverso) 5'-GGAAGTGGGACACTGAGG-3', y la sonda fue 5'-(6Fam)-CCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTA (Tamra)-3'.

El gen eucariótico de la RNaseP se amplificó utilizando una sonda marcada con VIC en el extremo 5' y no fluorescente en el extremo 3' (MGB, Applied Biosystems). El gen de la RNaseP se cuantificó simultáneamente para calcular el número de células eucarióticas presentes en las muestras de biopsia, como control positivo interno para garantizar que todas las muestras fueran aptas para la amplificación.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µL que contenía 25 µL de TaqMan Universal Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2,5 µL de mezcla de cebadores y sondas, 2,5 µL de mezcla 20X de RNaseP y 20 µL de molde correspondientes a 100 ng de ADN total.

Las concentraciones de cada cebador y sonda fueron, respectivamente, de 900 nM y 100 nM. Las condiciones de reacción para todas las plantillas fueron: 10 minutos a 95 °C para la activación enzimática, 40 ciclos con 15 segundos a 95 °C para la desnaturalización del ADN y 60 segundos a 60 °C para la hibridación y la extensión.

Todas las muestras se amplificaron por duplicado y se calculó el valor medio.

Aislamiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* mediante métodos de cultivo

En resumen, se sembraron 1/10 del volumen de las biopsias y los hisopos en placas de agar salino con manitol (Oxoid) para la detección de *S. aureus*, y en placas de agar con cefrimida (Oxoid) para la selección de *P. aeruginosa*. Tras 24 y 48 h de incubación a 37 °C, respectivamente, se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada microorganismo en cada placa.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de software Stat View (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EE. UU.). Los datos se analizaron mediante la prueba *U* de Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ (bilateral).

Resultados

Resultados clínicos

Los pacientes que respondieron al tratamiento se determinaron en función de un índice de Margolis positivo (reducción de más del 50 % del área de la herida). Las condiciones clínicas mejoraron significativamente en 7 de los 20 casos tratados con Cutimed™ Sorbact™ (35 % de pacientes que respondieron al tratamiento, reducción media del área del 77,49 %), con cicatrización completa en 2 casos. En otros 8 casos se observó una mejora general del estado de la herida, aunque el área de la herida disminuyera menos del 50 % (reducción media del 38,33 %). En 1 caso, el área de la herida no mostró variaciones y en los 4 casos restantes se produjo un aumento (aumento medio del área del 34,48 %). La tabla 1 muestra los resultados de la reducción de la herida en cada paciente, en comparación con la cuantificación de la carga microbiana y la presencia bacteriana.

Carga bacteriana en heridas crónicas

La cuantificación de la carga bacteriana total se evaluó mediante comparación con una curva estándar obtenida a partir de ADN purificado de *E. coli* diluido en serie 10 veces.

Las reacciones se realizaron con 100 ng de ADN total procedente de biopsias, amplificando simultáneamente tanto el gen bacteriano 16S rRNA, altamente conservado, como el gen eucariótico RNaseP, utilizado como control interno para la evaluación.

En el caso de los hisopos, las reacciones se realizaron con 100 ng de ADN extraído, amplificando el gen bacteriano 16S rRNA, y los resultados se normalizaron con respecto al volumen total del tampón de extracción.

La carga bacteriana media en la piel sana normal fue de 4.5×10^5 bacterias por hisopo, lo que representa la flora normal.

Tabla 1 Resumen de los resultados obtenidos cada paciente para

Pacientes	Δ Área (%) ^a	Δ Carga bacteriana total (biopsias) (%) ^b	Δ Carga bacteriana total carga (hisopos) (%) ^b	Δ Carga de Bacteroides (biopsias) (%) ^c	Δ Carga de Fusobacterium (biopsias) (%) ^c	Staphylococcus		Pseudomonas	
						Primera	Último	Nombre	Apellidos
1	-100	-100	-99,96	-100	-	-	-	-	-
2	-50	-99,98	+73,33	-99,99	-	+	+	+	+
3	-100	-100	-99,08	-	-	-	-	-	-
4	-90	-99,68	+70,93	-	-	-	-	-	-
5	-71,4	-99,17	-84,45	-99,998	-	+	-	-	-
6	-40	-98,28	-73,35	-100	-	+	-	-	-
7	-42,6	-91,45	-91,69	-	-	+	-	-	-
8	-34,6	-92,09	+36,51	-	-	-	-	-	-
9	-21,3	-87,85	+99,82	+57,33	-	-	-	-	+
10	-46,3	-85,53	-50,6	-85,32	-100	+	+	-	-
11	+5,8	+98,22	-99,98	+36,09	-	+	+	+	-
12	+72,7	+19,13	-99,74	-	-	-	-	-	-
13	+58,3	+41,06	+62,84	-	-	+	+	-	-
14	-0,5	-97,66	+92,93	-99,83	-	-	-	+	-
15	+1,1	-27,29	+43,08	+94,43	-	-	-	-	-
16	-44,7	+95,53	-77,97	+83,33	-	+	+	+	+
17	-64,3	-43,81	+99,98	-	-	+	-	-	-
18	-33,3	+11,48	+99,82	-	-	+	-	-	-
19	-43,8	+24,49	+99,63	-	-70	+	+	-	-
20	-66,7	+80,4	-99,72	-	-	-	+	-	-

^a Δ Área muestra la disminución (valor negativo) o el aumento (valor positivo) de la superficie de la herida al final del estudio, en comparación con el inicio, expresada en porcentaje

^b Δ Carga bacteriana total muestra la disminución (valor negativo) o el aumento (valor positivo) de la carga bacteriana total al final del estudio, en comparación con el inicio, según lo determinado por PCR en tiempo real panbacteriana. Los valores se expresan en porcentajes, en biopsias y frotis, respectivamente

^c Δ Carga de *Bacteroides* y *Fusobacterium* muestra el porcentaje de disminución (valor negativo) o el aumento (valor positivo) de la carga bacteriana al final del estudio en comparación con el inicio, según lo determinado mediante PCR en tiempo real específica

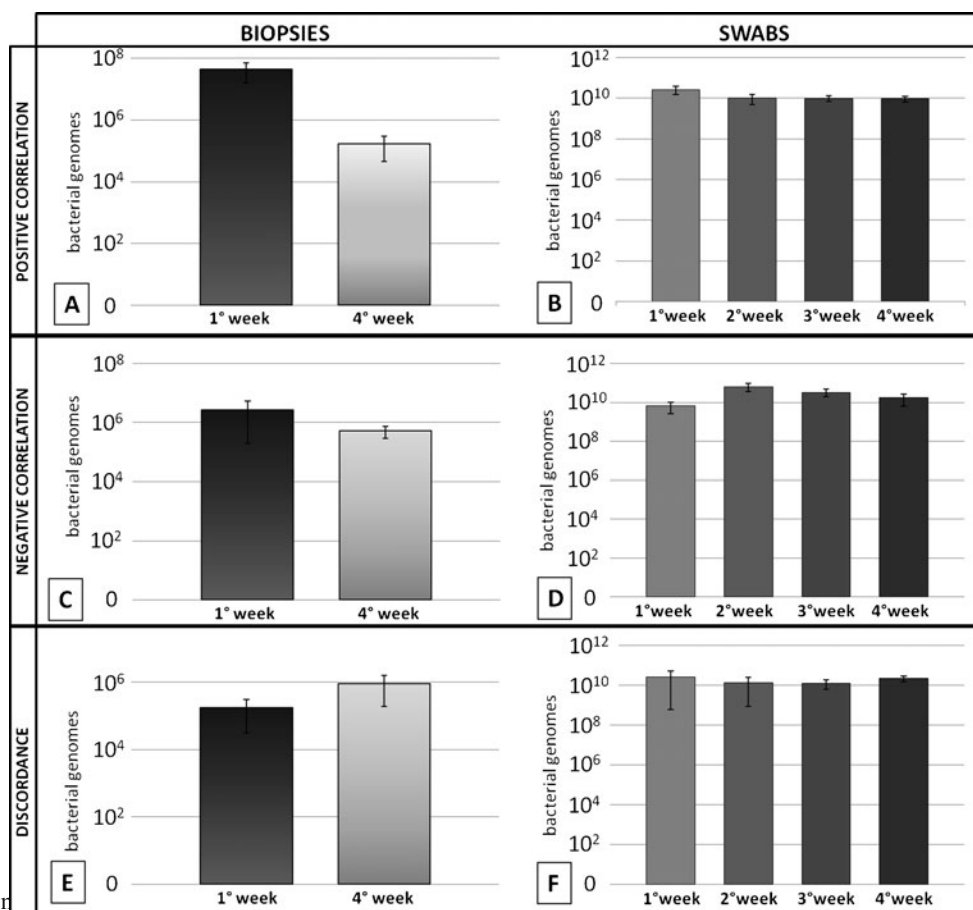
^d Las columnas etiquetadas como *Staphylococcus* y *Pseudomonas* muestran la presencia de estos gérmenes en la primera y la última biopsia, según lo determinado por métodos de cultivo convencionales

Los resultados se muestran en la Tabla 1, comparando para cada muestra la variación en la carga bacteriana y la reducción de la herida, durante las 4 semanas de tratamiento con CutimedTM SorbactTM. Según los resultados, las muestras pueden dividirse en tres grupos. El primer grupo está formado por muestras en las que el resultado clínico positivo concuerda con los datos moleculares. En concreto, 10 de las 15 heridas (66 %) con un resultado clínico positivo y con una reducción media del 58 % del área de la herida mostraron una disminución significativa de la carga bacteriana total. La carga bacteriana inicial variaba considerablemente entre las muestras, oscilando entre $4,38 \times 10^3$ y $2,44 \times 10^8$ genomas bacterianos/mg de tejido. No obstante, la media de la carga bacteriana total al inicio del tratamiento fue de $4,41 \times 10^7$ /mg de tejido, y al final disminuyó a $1,73 \times 10^5$ /mg de tejido, lo que corresponde a una disminución de 254 veces en la carga bacteriana total (fig. 1). La disminución de la carga bacteriana fue estadísticamente significativa ($p = 0,0243$).

El análisis de los hisopos tomados de las mismas heridas, recogidos una vez a la semana durante cuatro semanas, mostró una menor variabilidad entre las muestras de los distintos pacientes. La mayoría de las muestras arrojaron más de 10^9 bacterias totales en el muestreo inicial. El análisis de los momentos posteriores no mostró ninguna disminución significativa. De hecho, a pesar del resultado clínico positivo, la carga bacteriana se mantuvo constantemente alta, oscilando entre $2,63 \times 10^{10}$ en las primeras muestras y $9,37 \times 10^9$ genomas bacterianos/hisopo en las muestras finales (fig. 1).

El segundo grupo está formado por cinco heridas crónicas con un curso clínico negativo, sin respuesta al tratamiento, y con un aumento medio del 27 % en el área de la herida. La carga bacteriana total de las biopsias mostró una disminución no significativa de 5,2 veces al final del tratamiento (de $2,73 \times 10^6$ a $5,22 \times 10^5$ genomas bacterianos/mg de tejido; $p = 0,6$; Fig. 1). Además, los hisopos de estos cinco casos no mostraron ningún cambio significativo en la carga bacteriana a lo largo del periodo de 4 semanas del estudio (Fig. 1).

Fig. 1 Carga bacteriana total determinada mediante PCR panbacteriana en tiempo real en biopsias y frotis. Las muestras de los pacientes se han agrupado según el resultado clínico. a Carga bacteriana media en biopsias con resultados clínicos y moleculares concordantes. b Carga bacteriana media en los hisopos correspondientes. c Carga bacteriana media en biopsias con un resultado clínico positivo, pero sin disminución significativa de la carga bacteriana media. d Carga bacteriana media en los hisopos correspondientes. e Carga bacteriana media en biopsias que no tuvieron un resultado clínico positivo. f Carga bacteriana media en los hisopos correspondientes



El último grupo de muestras con un resultado clínico positivo (disminución media del 50 % en el área afectada), pero sin reducción de la carga bacteriana total en las biopsias. De hecho, se registró una reducción leve y no significativa de 5,3 veces ($p = 0,75$; fig. 1). Del mismo modo, la carga bacteriana total en los hisopos no varió durante el tratamiento (fig. 1).

Búsqueda de especies bacterianas específicas en heridas crónicas

Las biopsias de las heridas crónicas se analizaron mediante métodos clásicos de cultivo, sembrando en agar selectivo para la detección de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El recuento de colonias en la piel sana normal fue inferior a 100 UFC. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Se detectó *S. aureus* en 10 de las 20 biopsias al inicio del estudio, y persistió en 7 casos. Se detectó *P. aeruginosa* en 3 muestras, tanto en las biopsias iniciales como en las finales. Como se muestra en la Tabla 1, no hubo correlación con el resultado clínico, ni con los resultados de la PCR en tiempo real panbacteriana. Por ejemplo, el paciente 1 tuvo una recuperación clínica completa, con una marcada disminución de la carga bacteriana por qPCR, en ausencia total de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en ambas biopsias. Por el contrario, el paciente 2 tuvo un resultado clínico significativo y una disminución correspondiente de la carga bacteriana,

P. aeruginosa, tanto en la primera como en la última biopsia.

También se buscó mediante PCR en tiempo real la presencia específica de especies de *Fusobacterium* y *Bacteroides*, dos bacterias anaeróbicas que se detectan con frecuencia en las heridas crónicas. La sensibilidad de la reacción y la curva estándar se determinaron en diluciones seriadas de ADN genómico y plásmidos que contenían la región amplificada de *Fusobacterium* y *Bacteroides*. Ambas reacciones fueron lo suficientemente sensibles como para detectar tan solo 100 genomas totales. No se observó ninguna reacción cruzada entre los conjuntos de cebadores y sondas, y no se produjo amplificación de ADN de células eucariotas ni de otro ADN bacteriano al utilizar estos conjuntos de cebadores. Se alcanzó un rango lineal de amplificación de 10^2 a 10^7 moléculas totales (datos no mostrados). Se encontró *Bacteroides* en 10 de las 20 úlceras (50 %).

La carga de *Bacteroides* fue de una media de 8×10^7 genomas/mg de tejido en la primera biopsia y de 4×10^5 en la biopsia final, lo que muestra una disminución de 197 veces tras el tratamiento con Cutimed™ Sorbact™, sin diferencias estadísticas entre la primera y la última biopsia ($p=0,1$). En particular, con la excepción de dos muestras en las que *Bacteroides* desapareció tras el tratamiento con Cutimed™ Sorbact™, todos los casos positivos en la primera biopsia también lo fueron en la biopsia final.

Más concretamente, la presencia de ADN de *Bacteroides* fue independiente del resultado clínico, estando presente en 6

heridas pertenecientes al primer grupo de muestras (correlación positiva entre la carga bacteriana total y el resultado clínico), en 3 heridas del segundo grupo (ausencia de resultado clínico positivo) y en 1 herida del tercer grupo de muestras (resultado clínico positivo sin disminución de la carga bacteriana total).

Se encontró ADN de *Fusobacterium* en 2 de 20 heridas (10 %). La carga inicial fue de 1.7×10^8 genomas/mg de tejido, y la carga mostró una disminución no significativa de 3,5 veces (4.9×10^7 genomas/mg) tras el tratamiento con Cutimed™ Sorbact™.

Discusión

El objetivo de este trabajo era verificar, por primera vez, la idoneidad de la cuantificación mediante PCR en tiempo real de la carga bacteriana total como parámetro de laboratorio rápido y sensible. Para alcanzar este objetivo, se desarrolló una PCR en tiempo real panbacteriana basada en la amplificación de una región conservada del gen 16S, y se verificó en el genoma de seis bacterias diferentes. Los resultados muestran que este enfoque es sensible y permite una cuantificación precisa en un amplio rango de concentraciones (de 100 a 10^9 moléculas diana). Posteriormente, este método de análisis se aplicó en el marco de un estudio piloto sobre el uso de Cutimed™ Sorbact™, una membrana con propiedades hidrofóbicas que se une a las bacterias y las retiene, para el tratamiento de heridas crónicas.

Los resultados clínicos muestran que el tratamiento con Cutimed™ Sorbact™ dio lugar a un éxito completo de la terapia en 7 de 20 pacientes, y a una mejora general en otros 9 pacientes, aunque la reducción del área de la herida fuera inferior al 50 %. Este resultado positivo debe evaluarse teniendo en cuenta que las heridas seleccionadas eran persistentes y resistentes a otras opciones terapéuticas.

Los resultados de laboratorio de la PCR panbacteriana en tiempo real muestran que la carga bacteriana total disminuyó significativamente en 10 de las 15 heridas crónicas en proceso de cicatrización y no varió en 5 de las 5 heridas crónicas que no cicatrizaron. Además, la carga bacteriana disminuyó en las biopsias, pero no en los frotis. La microbiología clásica de dos aerobios ampliamente predominantes en las heridas crónicas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) no mostró ninguna correlación con el resultado clínico del tratamiento. Asimismo, la cuantificación molecular de dos anaerobios a menudo implicados en las heridas crónicas (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp.) tampoco mostró ninguna correlación con el resultado clínico.

De este estudio se desprenden varias observaciones. La primera muestra que la PCR en tiempo real panbacteriana es un método fiable para evaluar el éxito terapéutico del tratamiento de las heridas crónicas. De hecho, 10 de las 15 heridas crónicas con éxito terapéutico completo o parcial mostraron una disminución significativa de la carga bacteriana total, y no se observó ninguna disminución

en 5 de las 5 heridas sin mejoría clínica. En total, los resultados de la PCR en tiempo real coincidieron con los resultados clínicos en 15 de las 20 heridas crónicas, lo que indica que la carga bacteriana total podría considerarse un biomarcador útil para el pronóstico del tratamiento. La literatura científica destaca la necesidad de indicadores pronósticos de las úlceras crónicas. Una revisión reciente enumera varios biomarcadores potenciales (citocinas, proteasas y sus inhibidores, marcadores de senescencia, estrés oxidativo, estado microbiológico, etc.), pero concluye que no hay datos disponibles que reflejen la progresión o regresión de la herida [22]. Nuestro estudio indica que la PCR panbacteriana en tiempo real podría cubrir esta necesidad.

Otra observación es que los estudios de cuantificación de heridas crónicas mediante PCR panbacteriana en tiempo real requieren el análisis de biopsias. De hecho, no se obtuvo ningún resultado significativo mediante el análisis de hisopos. Aunque este resultado no pueda explicarse en este momento, existen varios informes que indican que el análisis de hisopos ofrece resultados inconsistentes [23]. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades recomiendan métodos de biopsia de tejido o de aspiración de líquido para determinar el contenido bacteriano de las heridas [24, 25]. Es posible que las heridas crónicas, incluso en una fase avanzada de cicatrización, sigan colonizadas por un elevado número de bacterias en la superficie, mientras que la infección de los tejidos profundos se ha eliminado. Según esta hipótesis, los hisopos bacterianos positivos indicarían únicamente la presencia de bacterias colonizadoras, mientras que los procesos infecciosos se están eliminando.

Nuestros resultados muestran que el análisis de patógenos específicos, incluso utilizando técnicas moleculares, es mucho menos eficaz que la PCR panbacteriana en tiempo real, y podría incluso resultar engañoso. De hecho, mediante cultivo convencional no se detectaron *S. aureus* ni

P. aeruginosa en la muestra número 12 (Tabla 1), y, sin embargo, esta lesión fue refractaria al tratamiento y mostró un aumento sustancial del área de la herida. Además, ambas bacterias continuaron estando presentes en la muestra número 2, aunque esta lesión respondió bien al tratamiento con una disminución significativa del área afectada y una disminución constante de la carga bacteriana. Se detectó una situación similar mediante el análisis de anaerobios por PCR en tiempo real. No se registró una disminución significativa de *Bacteroides* spp. en las heridas en proceso de cicatrización, y esta bacteria anaeróbica presentaba cargas similares en las lesiones en proceso de cicatrización y en las que no lo estaban (Tabla 1). Por el momento no es posible explicar con argumentos convincentes el hecho de que cinco heridas crónicas mostraran un resultado clínico positivo sin disminución de la carga bacteriana total. Las explicaciones plausibles son que la población bacteriana en estas úlceras fuera solo un componente patógeno menor, o que la presencia de bacterias reflejara la colonización, pero no la infección, por microorganismos. Alternativamente, es posible que estas cinco lesiones presentaran un componente fúngico o de levaduras [26] que fuera eliminado por el apósito. Otra explicación posible es que se produjera un cambio en la composición de la población bacteriana, y

que las bacterias más agresivas presentes en la primera biopsia hubieran sido sustituidas en la última biopsia por microorganismos comensales. Sin embargo, cabe señalar que *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Bacteroides* spp. no participaron en este proceso hipotético.

En conclusión, a pesar del reducido número de muestras analizadas, estos resultados muestran que la qPCR panbacteriana es un método prometedor y rápido para determinar la carga bacteriana total en las heridas crónicas, y sugieren que podría ser un biomarcador importante para el pronóstico de las heridas crónicas en tratamiento.

Agradecimientos Agradecemos sinceramente la asistencia técnica de AnnaLisa Peverati. Damos las gracias a Linda Marie Sartor por la revisión del manuscrito en inglés. Este trabajo ha sido financiado en parte por una beca FAR de la Universidad de Ferrara.

Acceso abierto Este artículo se distribuye bajo los términos de la Licencia Creative Commons Attribution Noncommercial, que permite cualquier uso, distribución y reproducción no comercial en cualquier medio, siempre que se cite al autor o autores originales y la fuente.

Referencias

- Gjodsbol K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jorgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA (2006) Múltiples especies bacterianas residen en las heridas crónicas es: un estudio longitudinal. *Int Wound J* 3:225–231
- Frank DN, Wysocki A, Specht-Glick DD, Rooney A, Feldman RA, St. Amand AL, Pace NR, Trent JD (2009) Diversidad microbiana en heridas abiertas crónicas. *Wound Repair Regen* 17:163–172
- Brook I, Frazier EH (1998) Microbiología aeróbica y anaeróbica de las úlceras venosas crónicas. *Int J Dermatol* 37:426–428
- Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW (2005) Una revisión de la microbiología, el uso de antibióticos y la resistencia en las heridas cutáneas crónicas. *J Antimicrob Chemother* 55:143–149
- Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG (2001) Microbiología de las heridas y enfoques asociados al tratamiento de las mismas. *Clin Microbiol Rev* 14:244–269
- Bowler PG, Davies BJ (1999) La microbiología de las úlceras de pierna infectadas y no infectadas. *Int J Dermatol* 38:573–578
- Madsen SM, Westh H, Danielsen L, Rosdahl VT (1996) Colonización bacteriana y cicatrización de las úlceras venosas de la pierna. *APMIS* 104:895–899
- Wolcott RD, Dowd SE (2008) Un método molecular rápido para caracterizar la carga bacteriana en heridas crónicas. *J Wound Care* 17:513–516
- Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB, Saunders AM, Bjarnsholt T, Givskov M, Kirketerp-Møller K, Nielsen PH (2010) La bacteriología de la úlcera venosa crónica de la pierna examinada mediante métodos moleculares independientes del cultivo. *Wound Repair Regen* 18:38–49
- Martin JM, Zenilman JM, Lazarus GS (2010) Microbiología molecular: nuevas dimensiones para la biología cutánea y la cicatrización de heridas. *J Invest Dermatol* 130:38–48
- Hill KE, Davies CE, Wilson MJ, Stephens P, Harding KG, Thomas DW (2003) Análisis molecular de la microflora en la úlcera venosa crónica de la pierna. *J Med Microbiol* 52:365–369
- Fang H, Hedin G (2003) Detección rápida e identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina a partir de muestras clínicas mediante cultivo selectivo en caldo y ensayo de PCR en tiempo real. *J Clin Microbiol* 41:2894–2899
- Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM (2005) Patógenos periodontales: una comparación cuantitativa entre el cultivo anaeróbico y la PCR en tiempo real. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45:191–199
- Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC (1990) Amplificación del ADN ribosómico 16S bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *J Clin Microbiol* 28:1942–1946
- Davies CE, Hill KE, Wilson MJ, Stephens P, Hill CM, Harding KG, Thomas DW (2004) Uso de la PCR del ADN ribosómico 16S y la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante para el análisis de la microflora de úlceras venosas crónicas de la pierna en proceso de cicatrización y sin cicatrizar. *J Clin Microbiol* 42:3549–3557
- Doyle RJ, Rosenberg M (eds) (1990) Hidrofobicidad de la superficie celular microbiana. ASM, Washington DC
- Ljungh A, Wadström T (1995) Las condiciones de crecimiento influyen en la expresión de la hidrofobicidad de la superficie celular de estafilococos y otros patógenos de infecciones de heridas. *Microbiol Immunol* 39:753–757
- Ljungh A, Yanagisawa N, Wadström T (2006) Uso del principio de interacción hidrofóbica para unir y eliminar las bacterias de las heridas. *J Wound Care* 15:175–180
- O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T (2000) Revisión sistemática sobre el tratamiento de las heridas: (3) agentes antimicrobianos para heridas crónicas; (4) úlceras del pie diabético. *Health Technol Assess* 4:1–237
- Wright JB, Lam K, Burrell RE (1998) Manejo de heridas en una era de creciente resistencia bacteriana a los antibióticos: el papel del tratamiento tópico con plata. *Am J Infect Control* 26:572–577
- Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, Rothman RE (2002) Ensayo cuantitativo de PCR multiprobeta para la detección simultánea e identificación a nivel de especie de patógenos bacterianos. *J Clin Microbiol* 40:3449–3454
- Moore K, Huddleston E, Stacey MC, Harding KG (2007) Úlcera venosa de la pierna por : en busca de un indicador pronóstico. *Int Wound J* 4:163–172
- Donovan S (1998) Infección de la herida y toma de muestras de la herida. *Prof Nurse* 13:757–759
- Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, Ruuskanen O, Alanen A, Kotilainen E, Toivanen P, Kotilainen P (2000) Amplificación directa de genes de ARN ribosómico en el diagnóstico de infecciones bacterianas. *J Clin Microbiol* 38:32–39
- Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D (2006) Análisis de 525 muestras para determinar la utilidad de la amplificación por PCR y la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S para el diagnóstico de infecciones óseas y articulares. *J Clin Microbiol* 44:1018–1028
- Dowd SE, Delton Hanson J, Rees E, Wolcott RD, Zischau AM, Sun Y, White J, Smith DM, Kennedy J, Jones CE (2011) Estudio sobre hongos y levaduras en infecciones polimicrobianas de heridas crónicas. *J Wound Care* 20:40–47