

BIOFILMS Y EL PROCESO DE SALUD ENFERMEDAD



BIOFILMS MICROBIANOS: rápido y furioso
CURSO PEDECIBA-BIOLOGIA 2019

PhD. Luciana Robino

1

Biofilms y salud



¿Alguna vez
presentaron
alguna
situación
relacionada a
la presencia
de **biofilms**?



Biofilms y salud

Biofilms (BF) de la mucosa vaginal:

- Lactobacillus acidificación del pH vaginal por fermentación de glucógeno (prevención de la colonización por microorganismos patógenos)

Placa dental:

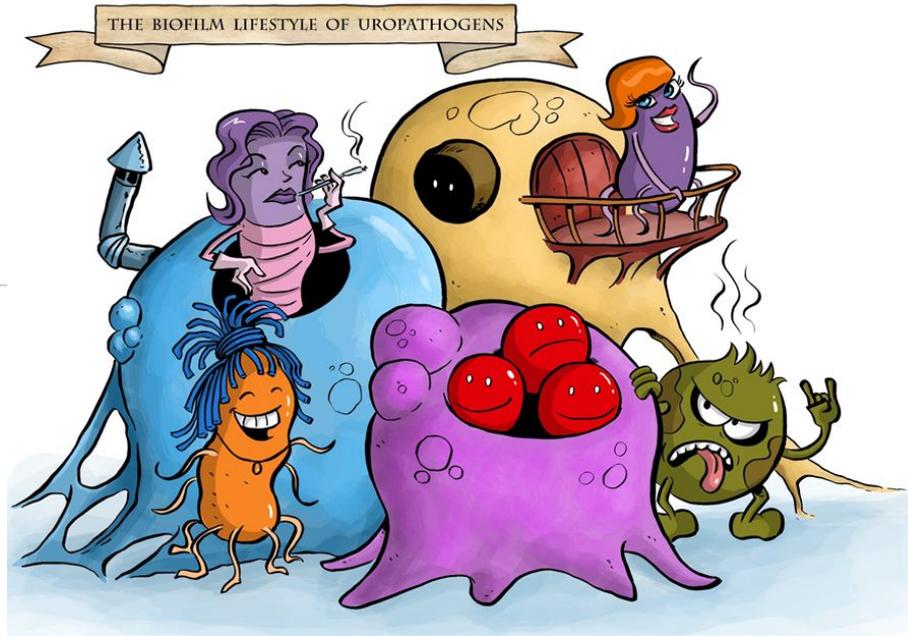
- Biofilms formados sobre la superficie de los dientes
- Protegen frente a la colonización por otros patógenos exógenos. Este biofilm suele estar compuesto en una persona por 20-30 especies bacterianas distintas: *Streptococcus* y *Actinomyces* spp.



Biofilms
can often be
good bacteria
but there is also
the bad...

2

Biofilms y enfermedad



65% de las infecciones bacterianas se asocian con biofilms



Biofilm y enfermedad

Asociado a dispositivos médicos

- Derivaciones ventriculares
- Lentes de contacto
- Tubos endotraqueales
- Catéteres vasculares centrales/periféricos
- Válvulas cardíacas protésicas, marcapasos
- Implantes mamarios
- Catéteres urinarios
- Prótesis osteoarticulares

No asociadas a dispositivos médicos

- Otitis media/ sinusitis crónicas
- Placa dental
- Laringitis crónica
- Endocarditis
- Infección pulmonar en fibrosis quística
- Litiasis urinaria
- Infección del tracto biliar
- Infección urinaria
- Osteomielitis
- Infección crónica de heridas



Biofilms e ITU asociada a catéter

4.1 millones de pacientes adquieren infecciones asociadas a los cuidados de la salud, anualmente en Europa.

Las ITU asociadas a catéteres son las más frecuentes.

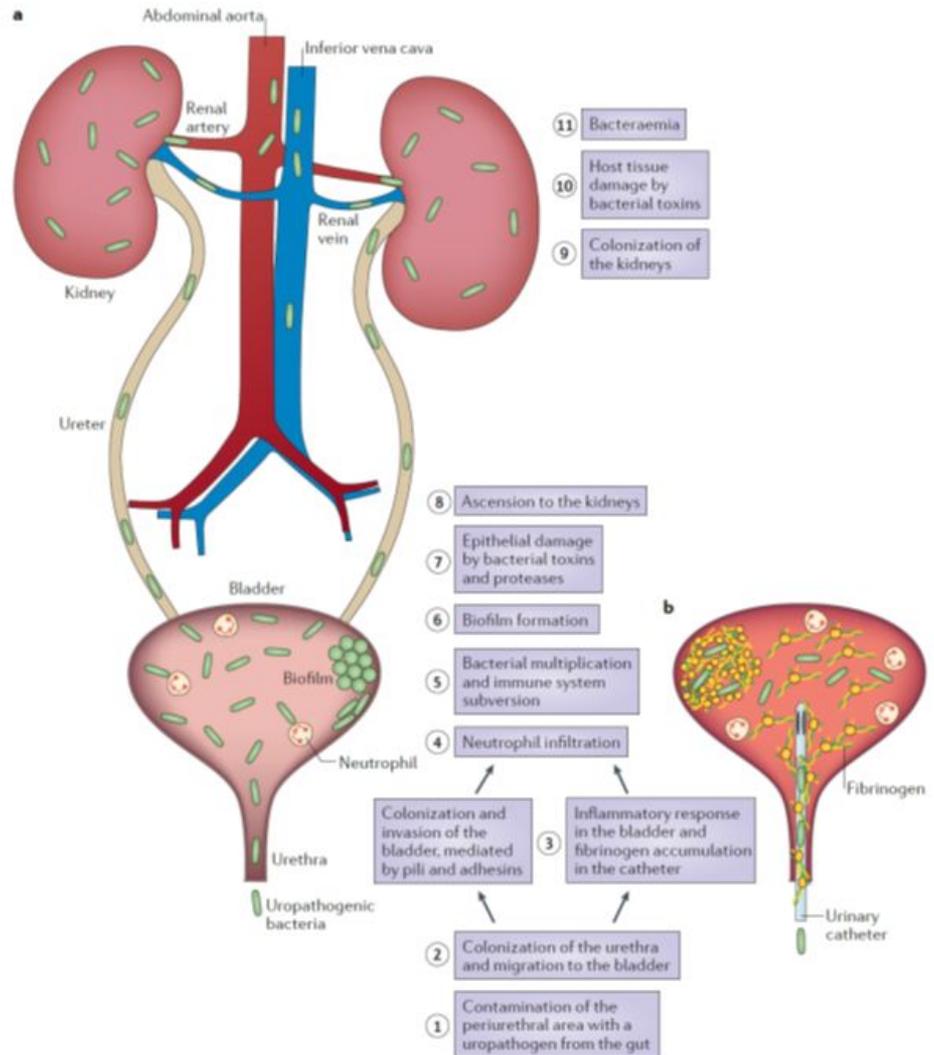


Biofilms e ITU asociada a catéter

- Infección del tracto urinario (ITU): infección que compromete algún sector del tracto urinario desde la uretra, vejiga, ureteres, hasta los riñones.
- 75% de las ITU adquiridas en los hospitales se asocian al uso de catéteres urinarios
- 15-25% de los pacientes hospitalizados presentan catéteres urinarios
- El principal factor de riesgo de desarrollar una ITU asociada a catéter es el uso prolongado del mismo (aumenta 3-7% cada día de cateterismo)

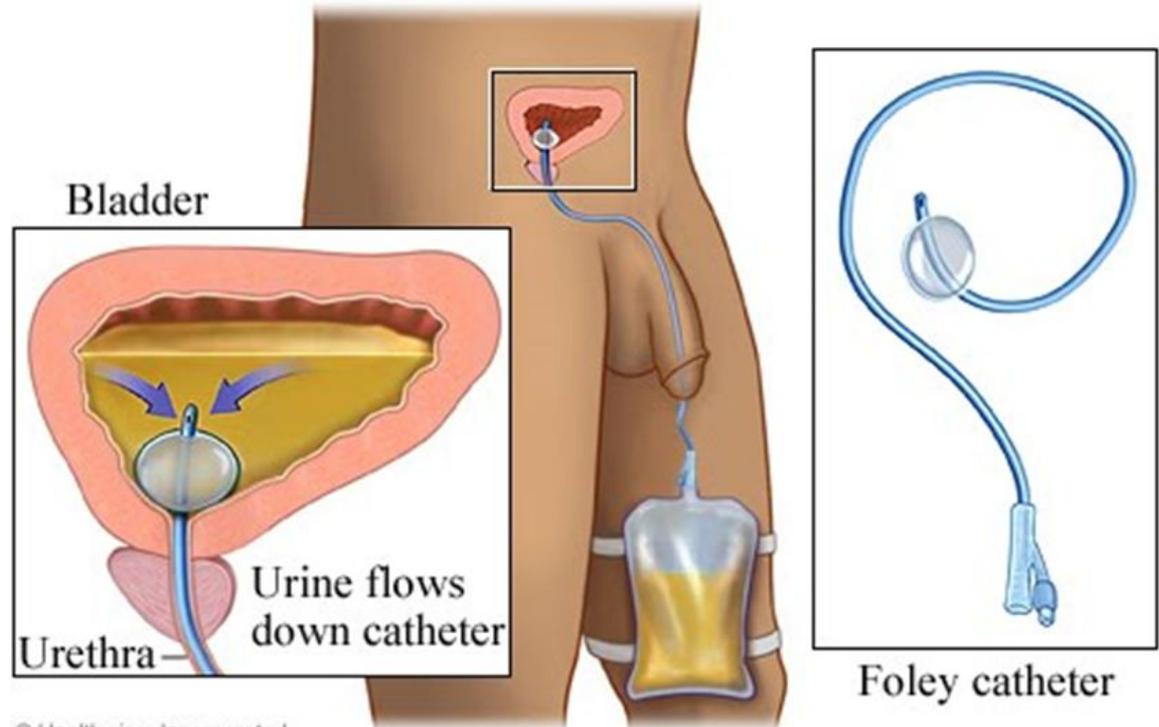


Biofilms e ITU associada a catéter



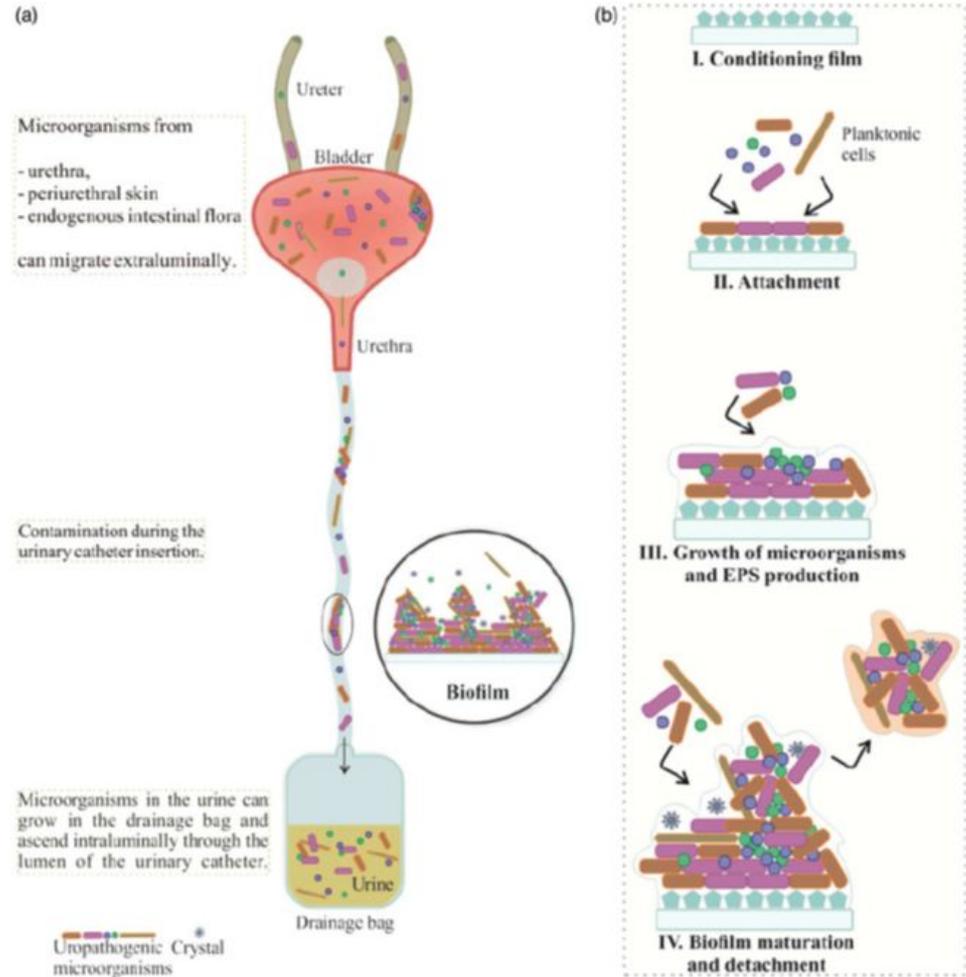


Biofilms e ITU associada a catéter



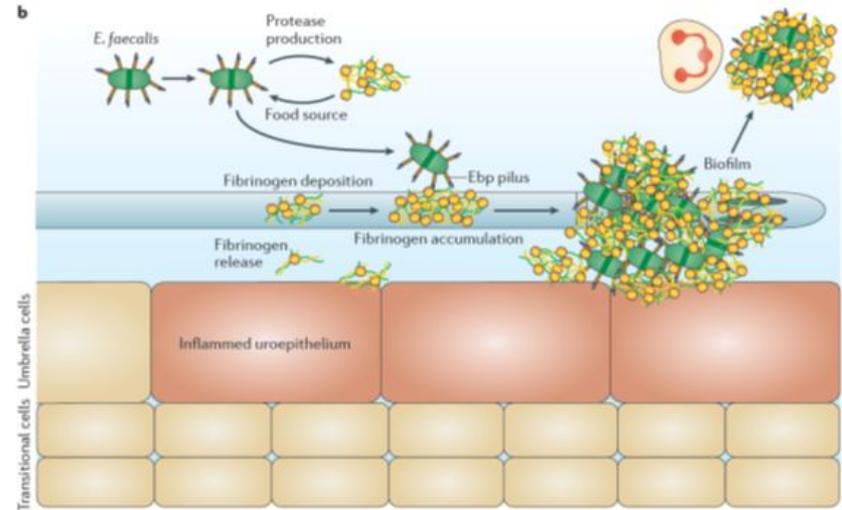
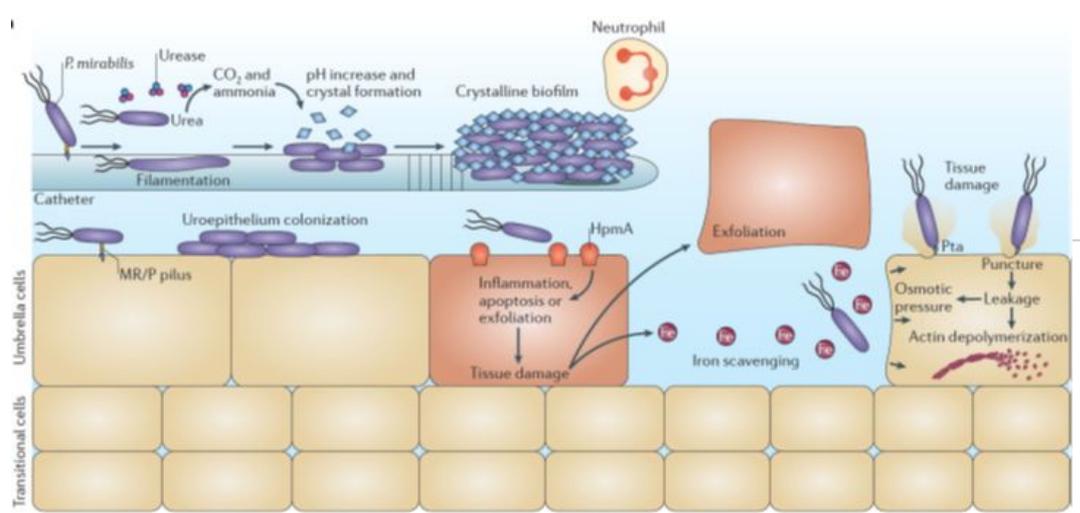


Patogénesis de la formación de biofilms sobre catéteres urinarios





Patogénesis de la formación de biofilms sobre catéteres urinarios





Biofilms e ITU asociada a catéter: etiología

Corto plazo

(menor 7 dias):

monomicrobiano

Prolongado

(sem-meses):

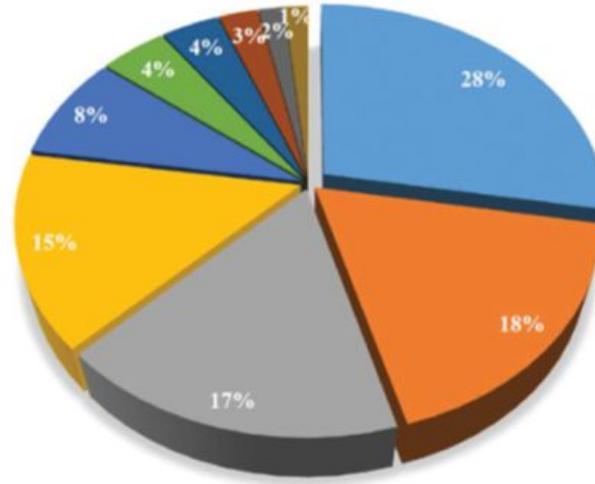
Polimicrobiano



Biofilms e ITU associada a catéter: etiologia

(a)

Most prevalent microorganisms



■ *E. coli*

■ *Enterococcus sp.*

■ *Klebsiella sp.*

■ *Proteus sp.*

■ *Morganella sp.*

■ *Candida sp.*

■ *P. aeruginosa*

■ *Enterobacter sp.*

■ Coagulase-negative staphylococci

■ *Acinetobacter sp.*

(b)

Other microorganisms

Prokarya	
Gram-negative	
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Sphingomonas sp.</i>	<i>Pantoe sp.</i>
<i>Oxalobacteraceae sp.</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Yersinia rohdei</i>
<i>Burkholderia fungorum</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Flavobacterium sp.</i>
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Citrobacter sp.</i>
Gram-positive	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Mycobacterium intravellulare</i>
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Raoultella terrigena</i>
<i>Fingoldia magna</i>	



Diagnóstico de ITU asociada a catéter

- ITU relacionada con el cateterismo urinario la que se presenta durante la permanencia de la SV o en las siguientes 72 h tras su retirada
- Bacteriuria asociada al cateterismo urinario se refiere a la presencia de un recuento significativo de bacterias en el urocultivo, en ausencia de síntomas urinarios (lo más frecuente).



Biofilm en infección de prótesis ósteo-articular

Frecuencia: 0,3 a 1,7% de la prótesis total de cadera (PTC)
0,8 a 1,9% en prótesis total de rodilla (PTR).
3 a 25% implantes osteo-articulares

Mayor riesgo en los primeros 2 años



Biofilm en infección de prótesis ósteo-articular

- Causas de pérdida de prótesis articular:
 - Aséptica
 - Séptica (infecciosa):
 - Cocos Gram +: 75%
 - *Staphylococcus coagulasa* negativos: 35%
 - *Staphylococcus aureus*: 25%
 - *Enterobacterias, Pseudomonas*: 10%
 - *Streptococcus, Enterococcus*: 10%

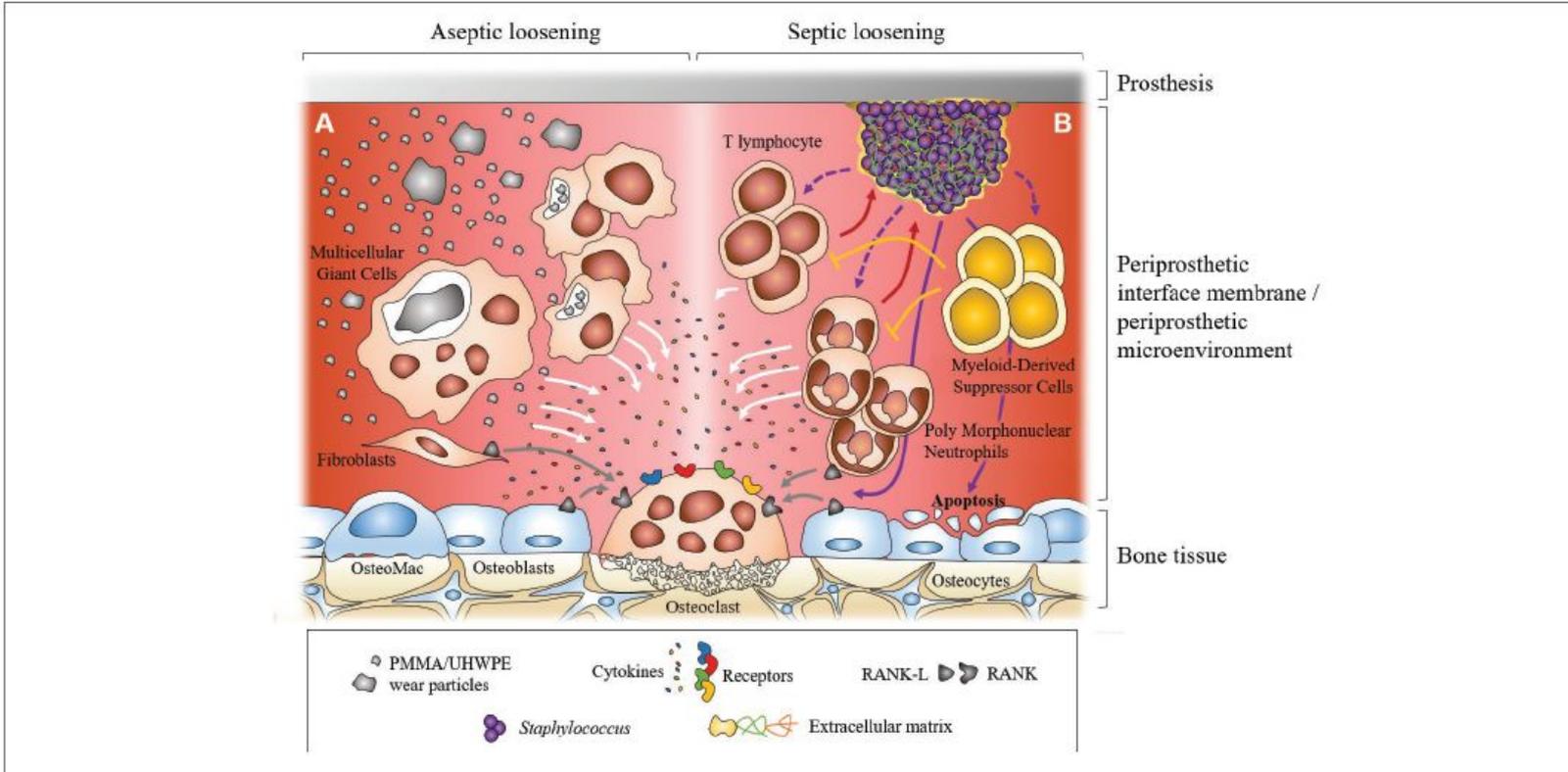
Table 1
Description of prosthetic joint infection by time from arthroplasty

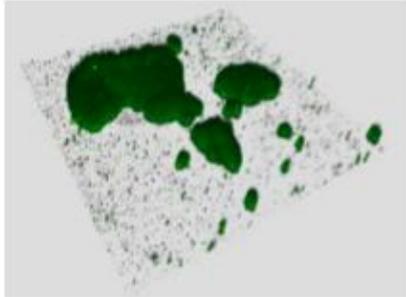
	Early Prosthetic Joint Infection	Delayed Onset (3–12 mo After Arthroplasty)	Late Onset
Synovial fluid			
White blood cell count (cells/ μ L)	>10,000	>3000	>3000
PMN (%)	>90	>80	>80
Serum CRP (mg/L)	>100 ²¹	>10	>10
Serum ESR (mm/h)	Not useful	>30	>30
Clinical presentation	Acute onset Wound drainage, fever, erythema, joint pain	Subacute joint pain; possible sinus tract formation, which diminishes pain	Systemic symptoms more likely with concomitant bacteremia, pain
Microbiologic differential	Virulent organisms <i>S aureus</i> Aerobic gram negative Polymicrobial Anaerobic	Less virulent Coagulase-negative staphylococci <i>Enterococcus</i> <i>Cutibacterium</i>	<i>S aureus</i> β -Hemolytic streptococci Gram-negative bacilli
Etiology	Acquired during arthroplasty	Acquired during arthroplasty, early postoperatively	Hematogenous from other infectious focus
Histopathology	More than 5 PMNs per high-power field in 5 high-power fields		

Typical laboratory values derived from International Consensus definition.²⁰ Low virulence organism criteria could not be met, yet PJI still is present.

Data from Parvizi J, Gehrke T, International Consensus Group on Periprosthetic Joint Infection. Definition of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty* 2014;29(7):1331.

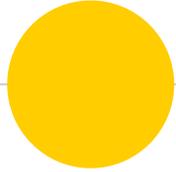
Infect Dis Clin N Am (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.06.005>





Biofilms

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS



DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Dificultades:

- Bacterias en biofilm
- Bajo inóculo
- “Small colony variants”: tasas de crecimiento lento
- Dificultades en la recolección de muestras, alta contaminación (ejemplo prótesis articulares)
- Protocolos no estandarizados, heterogeneidad entre laboratorios

Infección asociada a la formación de biopelículas	Muestras adecuadas	Observación microscópica	Procesamiento previo al cultivo
Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en Tejidos			
Infección pulmonar crónica	Secreciones bronquiales (esputo espontáneo, esputo inducido, lavado broncoalveolar o broncoaspirado)	Gram	Agitación con solución salina, sonicación suave
Rinosinusitis crónica	Secreciones purulentas	Gram	Agitación con solución salina, sonicación suave
Otitis crónica	Exudados, pus, aspirados (timpanocentesis)	Gram	En función de la consistencia (agitación con solución salina, sonicación suave)
Infección crónica de herida	Biopsias	Gram	Procesamiento de biopsias ^a
Infección en pacientes quemados	Biopsias	Gram	Procesamiento de biopsias ^a
Infección de válvula cardíaca nativa	Hemocultivos	Gram	No
Infección prostática	Orina comienzo micción, orina chorro medio, secreción prostática y orina post masaje prostático	Gram	No
Vaginosis	Secreción vaginal	Gram	No (no se recomienda la realización de cultivo)

Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en cuerpos exógenos			
Infección asociada a catéter vascular	Sin retirar catéter: hemocultivo	Gram	No
	Con retirada de catéter: punta catéter	Gram rodado ^b	Controvertido ^b (sonicación, lavado intraluminal, etc), método <i>standard</i> Maki sin procesamiento previo
Endocarditis sobre válvula cardíaca protésica	Hemocultivos	Gram	No
	Si reemplazo valvular o necropsia: vegetación	Gram	Procesamiento de biopsias ^a
Infección asociada a dispositivos de electroestimulación: Marcapasos, desfibriladores implantables y dispositivos de resincronización	Sin retirada dispositivo: hemocultivo	Gram	No
	Con retirada dispositivo: dispositivo	Gram	Sonicación dispositivo
Neumonía asociada a ventilación mecánica	Secreciones bronquiales (esputo espontáneo, esputo inducido, aspiración nasotraqueal, aspiración endotraqueal, broncoscopia)	Gram	Agitación con solución salina, sonicación suave
Infección asociada a prótesis articular	Líquido sinovial	Gram	No
	Tejido periprotésico.	No ^c	Procesamiento de biopsias ^a
	Prótesis	Gram sonificado	Sonicación
Infección asociada a sonda urinaria	Orina (sonda)	Gram	No
Infección asociada a otro tipo de dispositivos biomédicos (implantes de mama, malla abdominal, pene, etc)	Dispositivo retirado	Gram sonificado	Sonicación
	Colección perimplante	Gram	En función consistencia (agitación con solución salina, sonicación suave)

Del Pozo L (SEIMC); 60: 2017



Microscopía

- . Óptica
- . Confocal
- . Microscopía mediante hibridación de fluorescencia in situ (FISH)
- . Microscopía electrónica



Cultivo

- De acuerdo al tipo de infección: procesamiento de muestra, medio de cultivo, incubación
- Liberar los microorganismos de la biopelícula para que puedan ser cultivados en los medios de cultivo:
 - Sonicación
 - Trituración
 - Agitación
- Cuantitativo o semicuantitativo

Diagnóstico Microbiológico de infección de prótesis articular

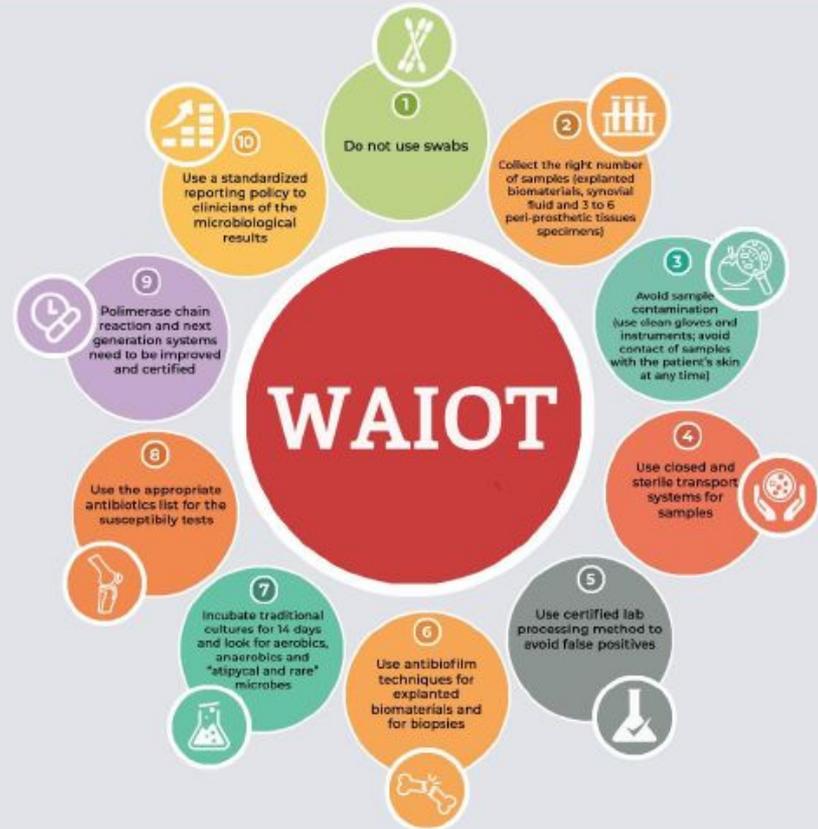


Drago L. J. Clin. Med. 2019, 8, 933;
doi:10.3390/jcm8070933

10

WAIOT GOLDEN RULES

Microbiology best practice for the diagnosis of peri-prosthetic joint infections and implant-related infections in ortho-trauma





Diagnóstico Microbiológico de infección de prótesis articular

Muestras:

- Fase preoperatoria: líquido sinovial, hemocultivos, biopsia percutánea de tejidos periprotésicos
- Fase intraoperatoria: Líquido sinovial ó de la cápsula articular, tejido periprotésico (mínimo 4 muestras), componentes de la prótesis removidos

Si se va a sonicar: cubrir 90% de la superficie con suero fisiológico estéril.



Diagnóstico Microbiológico de infección de prótesis articular

Transporte de las Muestras:

- Conservar a 4°C
- Frascos de hemocultivo a temperatura ambiente



Diagnóstico Microbiológico de infección de prótesis articular

Procesamiento de las muestras por sonicado

- Vortexear 30 s
- Sonicado: 30–40 KHz 0.22 0.04W/cm² por 5 min
- Vortexear 30 s
- Centrifugación 5 min, 3000 xg ¿?



Diagnóstico Microbiológico de infección de prótesis articular Procesamiento de las muestras por Dithiothreitol (DTT):

- ◉ Solución de DTT 0.1% en PBS estéril para cubrir el material protésico.
- ◉ Agitar por 15 min a 80 rpm



Diagnóstico Microbiológico de infección de prótesis articular

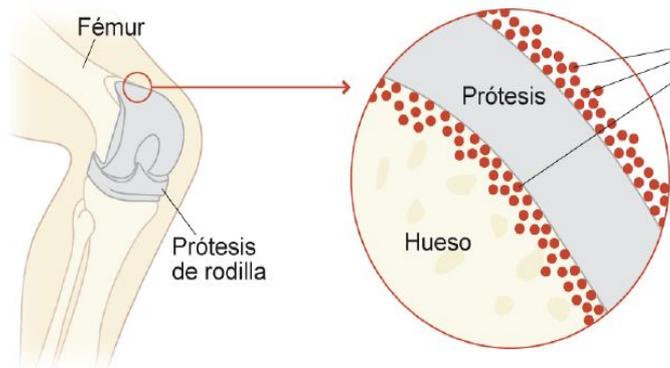
Procesamiento de las Muestras:



Aerobio: incubación 7 días

Anaerobio: incubación 14 días

LOS BIOFILMS



Biofilm:

Es una infección producida por una capa de bacterias que se adhiere a las prótesis. Es una de las causas de dolor en pacientes portadores de prótesis articulares

Es muy difícil de detectar



Análisis de sangre

✗ No detectan la infección

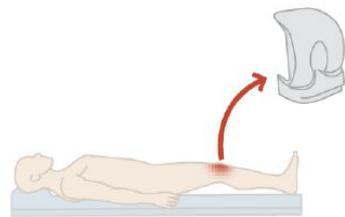


Biopsias

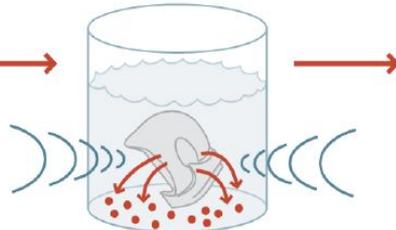
Son el procedimiento habitual, pero sólo se consigue aislar la bacteria en el 65% de los casos

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PROPUESTO

1 Extracción de la prótesis
En quirófano



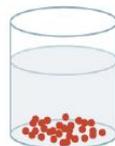
2 Sonicación
La prótesis se introduce en un recipiente y se trata con ultrasonidos para que las bacterias se separen de ella



3 Búsqueda de bacterias

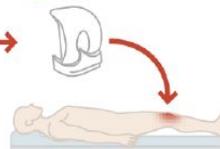


No hay bacterias
El dolor se debía a que la prótesis se había movido



Sí hay bacterias
El dolor se debía a la infección. Se estudia el tipo de bacteria y su perfil de sensibilidad a los antibióticos

4 Tratamiento



Se podría colocar una nueva prótesis sin riesgo



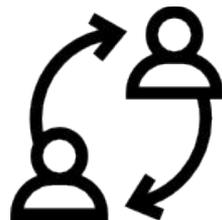
Antes habrá que acabar con la infección con antibióticos



Definition Source	MSIS 2011 [1]	IDSA 2013 [2]	ICM 2013 [3]	ICM 2018 [4]	Proposed EBJIS 2018 [5]
Scoring system	1 of the 2 Major Criteria OR ≥4 of 6 Minor Criteria *	≥1 Positive Criteria *	1 of the 2 Major Criteria OR ≥3 of 5 Minor Criteria *	1 of the 2 Major Criteria OR Minor criteria scoring ≥6 Infected 3-5 Possibly infected ("Consider further molecular diagnostics such as next-generation sequencing") <3 Not infected *	≥1 Positive Criteria
	*"PJI may be present if fewer than four of these criteria are met"	*"The presence of PJI is possible even if the above criteria are not met (...)"	*"PJI may be present without meeting these criteria, (...)."	*"Proceed with caution in adverse local tissue reaction, crystal deposition disease, slow growing organisms"	
Criteria	Major: 1. Sinus tract communicating with the prosthesis; 2. A pathogen is isolated by culture from at least two separate tissue or fluid samples obtained from the affected prosthetic joint Minor: (a) Elevated ESR (>30 mm/h) and CRP (>10 mg/L) concentration (b) Elevated synovial leukocyte count (c) Elevated PMN% (d) Purulence in the affected joint (e) Isolation of a microorganism in one culture of periprosthetic tissue or fluid (f) Greater than five neutrophils per high-power field in five high-power fields observed from histologic analysis of periprosthetic tissue at ×400 magnification	1 Sinus tract communicating with the prosthesis 2 Purulence without other etiology surrounding the prosthesis 3 Acute inflammation seen on histopathological examination of the periprosthetic tissue 4. ≥2 intraoperative cultures or combination of preoperative aspiration and intraoperative cultures yielding an indistinguishable organism (the growth of a virulent microorganism (e.g., <i>Staphylococcus aureus</i>) in a single specimen of a tissue biopsy or synovial fluid is also considered as indicative of a PJI)	Major: 1. A sinus tract communicating with the joint 2. Two positive periprosthetic cultures with phenotypically identical organisms, Minor: (a) Elevated ESR (>30 mm/h) and CRP (>100 mg/L for acute infections; >10 mg/L for chronic infections) (b) Elevated synovial fluid WBC count (>10,000 cells/mL for acute infections; >3000 cells/mL for chronic infections) or ++ change on leukocyte esterase test strip (c) Elevated PMN% (>90% for acute infections; >80% for chronic infections) (d) Positive histological analysis of periprosthetic tissue (>5 neutrophils per high-power field in five high-power fields observed on periprosthetic tissue at ×400 magnification) (e) A single positive culture	Major: 1. Sinus tract with evidence of communication to the joint or visualisation of the prosthesis 2. Two positive growths of the same organism using standard culture methods Minor: (a) Elevated CRP (>100 mg/L for acute infections; >10 mg/L for chronic infections) or D-Dimer (unknown threshold for acute infection; >860 µg/L for chronic infection) (score 2) (b) Elevated ESR (no role for acute infections; >30 mm/h for chronic infections) (score 1) (c) Elevated synovial WBC count (>10,000 cells/mL for acute infections; >3000 cells/mL for chronic infections) OR Leukocyte Esterase (++ for acute and chronic infections) OR Positive alpha-defensin (score 3) (d) Elevated synovial PMN% (>90% for acute infections; >70% for chronic infections) (score 2) (e) Single positive culture (score 2) (f) Positive histology (score 3) (g) Positive intraoperative purulence (score 3)	1. Purulence around the prosthesis or sinus tract 2. Increase synovial fluid leukocyte count (>2000 cells/mL or >70% granulocytes) 3. Positive histopathology 4. Confirmatory microbial growth in synovial fluid, periprosthetic tissue, or sonication culture ("Confirmatory microbial growth in periprosthetic tissue: if positive in ≥1 specimen in highly virulent organisms or ≥2 in low virulent pathogens; sonication culture considered positive if >50 colony-forming units/mL of sonication fluid.")

RESISTENCIA

ANTIMICROBIANA



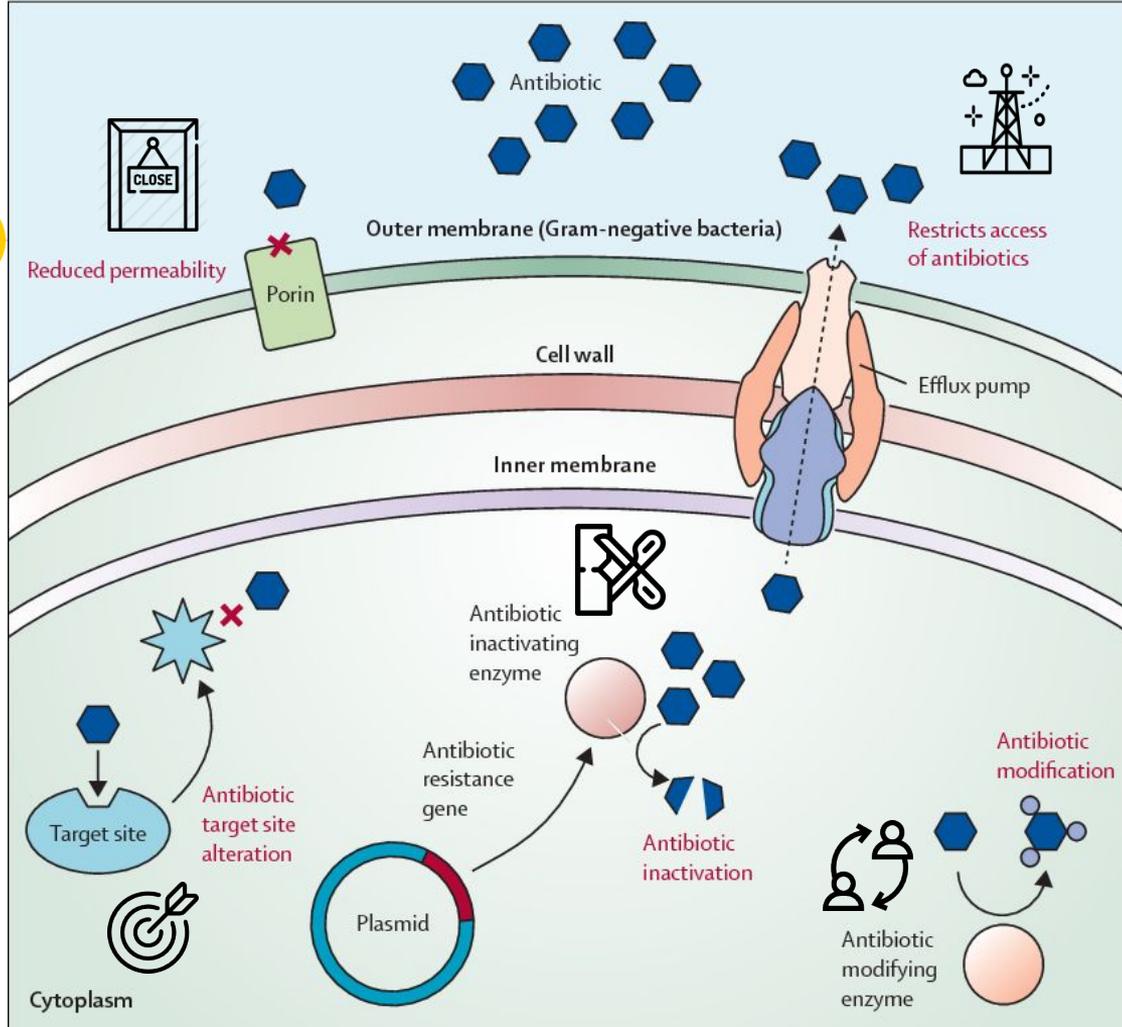


Figure 2: Examples of mechanisms of antibiotic resistance in a bacterial cell *Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis.*

Resistencia = Tolerancia

Tolerancia física

+

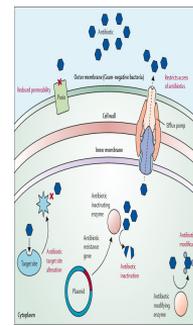
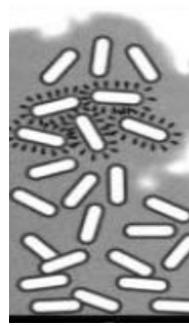
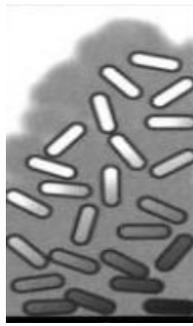
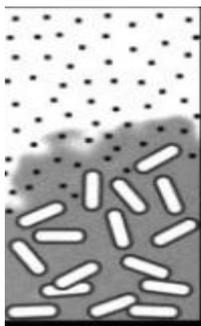
Tolerancia fisiológica

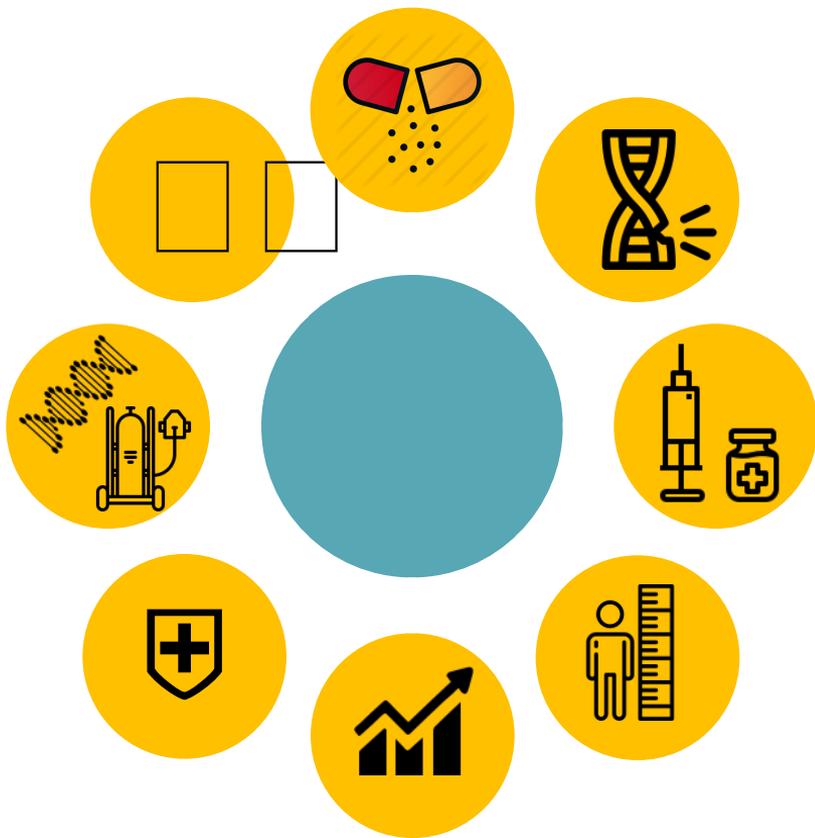
+

Tolerancia adaptativa

+

Resistencia convencional







↑ CIM 100-1000 veces

Mayor resistencia: Antibioticos, Desinfectantes y Germicidas



Tolerancia física

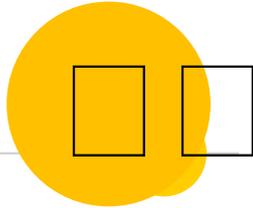


Presencia matriz
Baja penetración

Componentes de la matriz

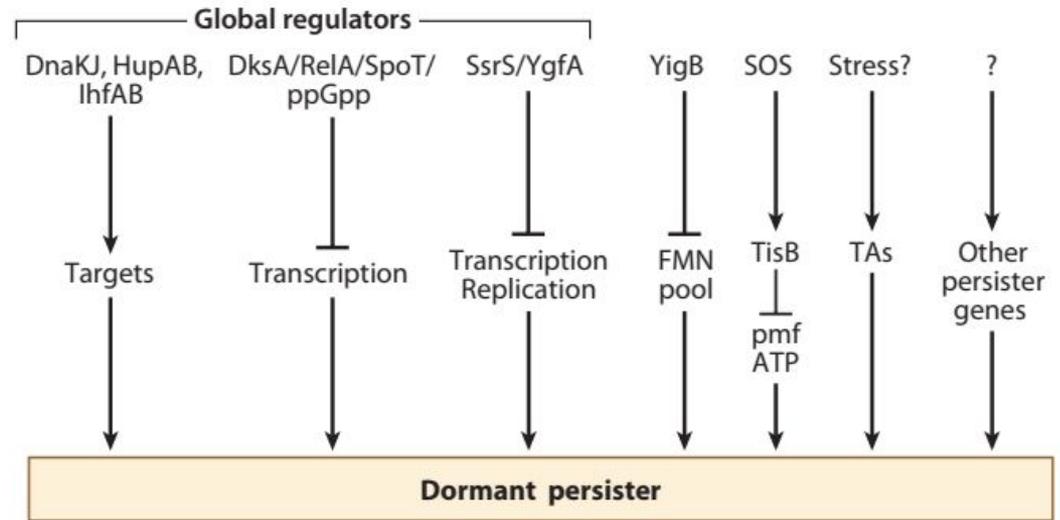
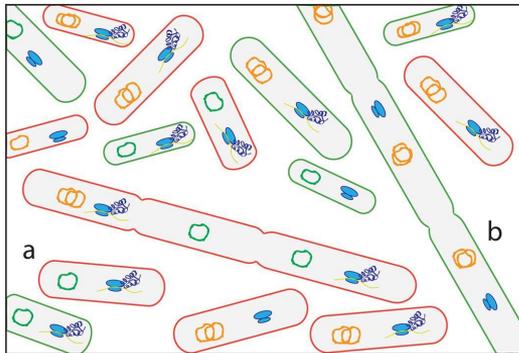
ADN extracelular
Oxigenación

Antibiotic class/agent	Microorganism	Extent of penetration	Rate of penetration	Reference
Fluoroquinolones				
Ciprofloxacin	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	100%	NR	10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	Rapid	74
	<i>P. aeruginosa</i>	25%–50%	Rapid	75
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80%–100%	Rapid	11
	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	86%–100%	NR	76
Levofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>	100%	Rapid	75
Rifamycins				
Rifampin	<i>S. epidermidis</i>	79% to >90%	Rapid	77,78
Oxazolidinones				
Linezolid	<i>S. epidermidis</i>	–100% ^a	Rapid	79
Lipopeptides				
Daptomycin	<i>S. epidermidis</i>	≥100% ^b	Rapid	80
Tetracyclines				
Tetracycline	<i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i>	88%–93%	NR	10
Macrolides				
Erythromycin	<i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i>	72%–86%	NR	10
	<i>S. epidermidis</i>	45%–93%	Variable/slow	81
Beta-lactams				
Ampicillin	<i>K. pneumoniae</i> (beta-lactamase positive)	0%	NA	11
	<i>K. pneumoniae</i> (beta-lactamase negative)	80%–100%	Rapid	11
Oxacillin	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	<70%	NR	76
Piperacillin	<i>P. aeruginosa</i>	50%–100%	Rapid	75
	<i>P. aeruginosa</i>	0%–15%	NR	82
Cefotaxime	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	68%–70%	NR	76
Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>	50%–100%	Rapid	75
Glycopeptides				
Vancomycin	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	<70%	NR	76
	<i>S. epidermidis</i>	Adequate ^c	Slow	77,83
	<i>S. aureus</i>	Adequate ^{b,d}	Slow	9
Aminoglycosides				
Streptomycin	<i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i>	0%–60%	NR	10
Tobramycin	<i>P. aeruginosa</i>	40%	Slow	74
Gentamicin	<i>P. aeruginosa</i>	<25%	Slow	75
Amikacin	<i>P. aeruginosa</i>	<25%	Slow	75
	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	79%–98%	NR	76



Tolerancia **Fisiológica:** Alteración en la **tasa de crecimiento**

Crecimiento lento
Superficie vs profundidad
Células **persisters**



Persister cells.

Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them.

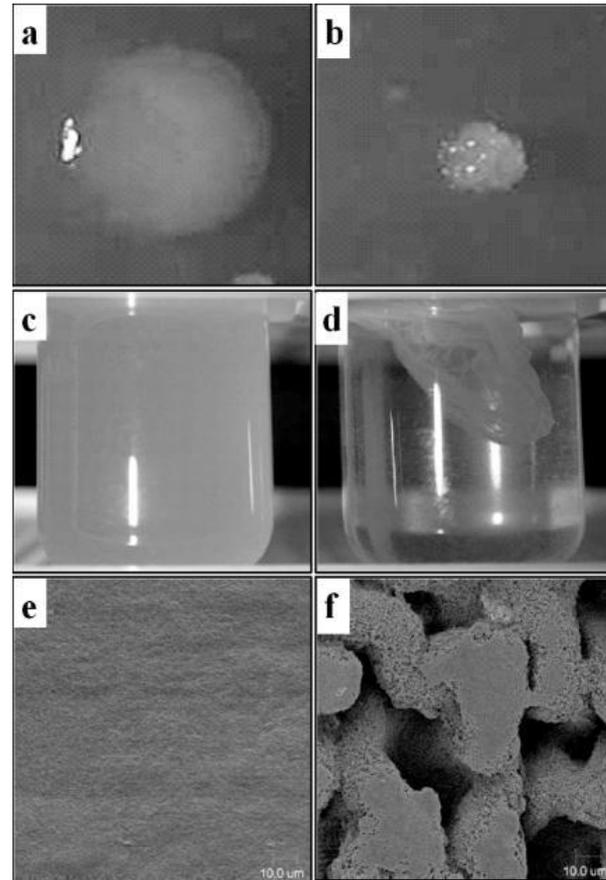


Variaciones en el tamaño

Small colony variant
Rough small-colony variant

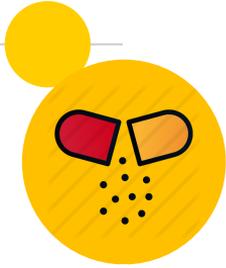
Cambios en su **adherencia**

Interacciones
polimicrobianas





Tolerancia **adaptativa**:



Genes
codificantes
de Resistencia

Presencia de genes de
resistencia
Aumento en la **expresión**
Intercambio genético

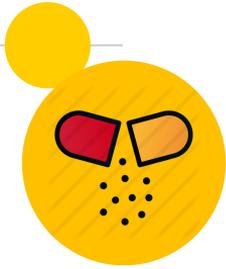


Tasa
de
hipermutación

Aumento en presencia de **ATB**
Respuesta frente al stress



Tolerancia **adaptativa**:



Genes
codificantes
de Resistencia

Presencia de genes de
resistencia
Aumento en la **expresión**
Intercambio genético



Tasa
de
hipermutación

Aumento en presencia de **ATB**
Respuesta frente al stress



Tratamientos Prolongados
concentraciones **subóptimas**

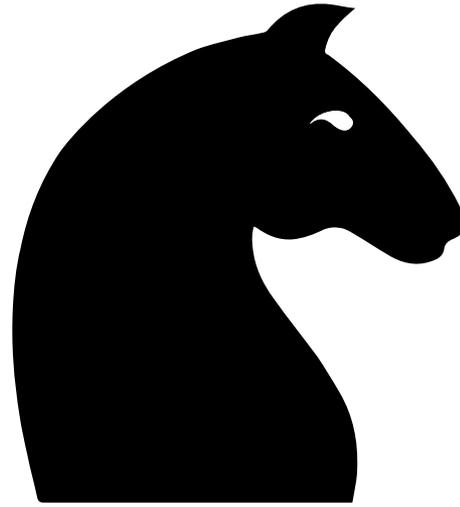
Table 1 | **Biofilm tolerance of antibiotics and biocides**

Antibiotics and biocides	Physical (biofilm matrix-related) tolerance	Physiological tolerance	Adaptive tolerance*
β -lactam	Diffusion partially impaired ⁹¹	No activity on non-dividing cells ²³⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Induction of β-lactamase, which can impair diffusion in the biofilm by hydrolysing the β-lactam molecules⁹⁸ • Subinhibitory concentrations induce alginate genes⁷³ • Upregulation of efflux pumps as stress response¹⁰¹
Quinolones	No impact ²⁴⁰	Impaired activity in anaerobic conditions [‡]	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulation of efflux pumps as stress response¹⁰¹ • Upregulation of PA1874-1877 multidrug efflux pump in combination with <i>ndv</i> (PA14)²⁴¹
Aminoglycosides	<ul style="list-style-type: none"> • Diffusion impaired by alginate²⁴² • Extracellular DNA chelates cations and thereby creates cation-limited conditions; this induces LPS modifications and impaired self-promoted uptake of antibiotics²⁴³ 	Impaired activity on non-dividing cells ³¹	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulation of MexXY efflux pumps²⁴⁴ • Subinhibitory concentrations induce biofilm formation⁷⁴ • <i>ndv</i>-dependent glucan production in the periplasm and sequestration of aminoglycosides in this compartment²⁴⁶ • Upregulation of PA1874-1877 multidrug efflux pump in combination with <i>ndv</i>²⁴¹
Antimicrobial peptides and other membrane-active biocides	Extracellular DNA chelates cations and thereby creates cation-limited conditions; this induces LPS modifications and impaired self-promoted uptake of antibiotics ²⁴³	-	<ul style="list-style-type: none"> • Specific: induction of <i>arn</i> operon and LPS modification • Nonspecific: upregulation of efflux pumps^{17,100} • Upregulation of efflux pumps as stress response¹⁰¹
Azithromycin	-	-	Upregulation of MexCD-oprJ efflux pump ⁹⁹



Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed?.

Estudios de susceptibilidad antibiótica



PLANCTÓNICA



BIOFILM

Estudios de susceptibilidad antibiótica Planctónicas

RESISTENTE
INTERMEDIA
SENSIBILIDAD

Métodos

CUALITATIVOS

CONCENTRACION
INHIBITORIA
MÍNIMA
(CIM)

CONCENTRACION
BACTERICIDA
MÍNIMA
(CBM)

Métodos

CUANTITATIVOS

RESISTENTE
INTERMEDIA
SENSIBILIDAD

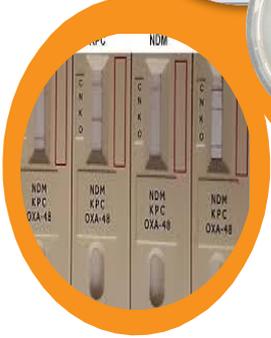
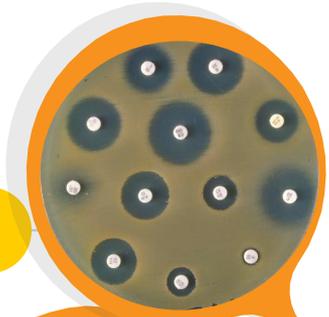




Table 2A. Enterobacteriaceae (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
PENICILLINS											
A	Ampicillin	10 µg	≥17	–	14–16	≤13	≤8	–	16	≥32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See general comment (2).

Enterobacteriaceae

EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0, valid from 20

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)

Medium: Mueller-Hinton agar

Inoculum: McFarland 0.5

Incubation: Air, 35±1°C, 18±2h

Reading: Read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a dark background illuminated with reflected light.

Quality control: *Escherichia coli* ATCC 25922

Penicillins ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Benzylpenicillin	-	-	-	-	-	1/A. Wild type Enterobacteriaceae are categorised as susceptible to aminopenicillins.
Ampicillin	8 ¹	8	10	14 ^{A,B}	14 ^B	Some countries prefer to categorise wild type isolates of <i>E. coli</i> and <i>P. mirabilis</i> as intermediate. When this is used the MIC breakpoint S ≤ 0.5 mg/L and the corresponding zone diameter breakpoint S ≥ 50 mm.
Ampicillin-sulbactam	8 ^{1,2}	8 ²	10-10	14 ^{A,B}	14 ^B	
Amoxicillin	8 ¹	8	-	Note ^C	Note ^C	2. For susceptibility testing purposes, the concentration of sulbactam is fixed at 4 mg/L.
Amoxicillin-clavulanic acid	8 ^{1,3}	8 ³	20-10	19 ^{A,B}	19 ^B	3. For susceptibility testing purposes, the concentration of clavulanic acid is fixed at 2 mg/L.
Amoxicillin-clavulanic acid (uncomplicated UTI only)	32 ^{1,3}	32 ³	20-10	16 ^{A,B}	16 ^B	4. For susceptibility testing purposes, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.
Piperacillin	8	16	30	20	17	5/D. Mecillinam (pivmecillinam) breakpoints relate to <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i> only.



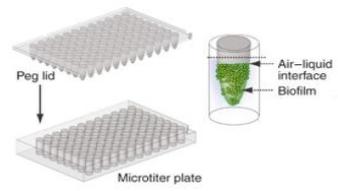
Métodos de estudio Biofilm



Cerrados o estáticos
(batch cultures)

Sencillos
Reproducibles
Bajo costo
Sin contaminaciones

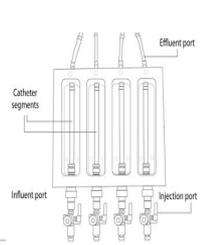
Modelo de biopelícula	Placas microtiter	Dispositivo de Calgary
Disponibilidad de nutrientes ^a	Sistema cerrado (estático)	Sistema cerrado (estático)
Formación de biopelícula	Adherencia a los pocillos (poliestireno, polipropileno o policarbonato)	Adherencia a los pinchos/púas (poliestireno, polipropileno o policarbonato)
Estudio antimicrobiano	Pocillos incubados con los antimicrobianos. Lavado, aclarado y renovación del medio diariamente	Biopelículas en las púas incubadas con los antimicrobianos. Lavado, aclarado y renovación del medio diariamente
Biomasa/recuento UFC	Tinción con CV Disolución con etanol Lectura de la absorbancia a 570 nm (lector de placas de micropocillos)	Transferencia de las biopelículas por centrifugación o sonicación. Medida de la DO a 650 nm. (0-6h a 37°C) Siembra de diluciones seriadas 1/10
Análisis microscópico	Estudios de viabilidad (proporción de vivos/muertos)	MEB MLC Ambas requieren fijación y tinción, técnicas destructivas para las biopelículas
Análisis estructural	No se ha descrito	Estudios de imagen 3D y viabilidad (proporción de vivos/muertos)
Características relevantes	Sencillo y reproducible. Bajo riesgo de contaminación Grosor de la biopelícula < 50 µm	Sencillo y reproducible. Bajo riesgo de contaminación Grosor de la biopelícula < 50 µm
Microorganismos estudiados	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp.



Abiertos o continuos

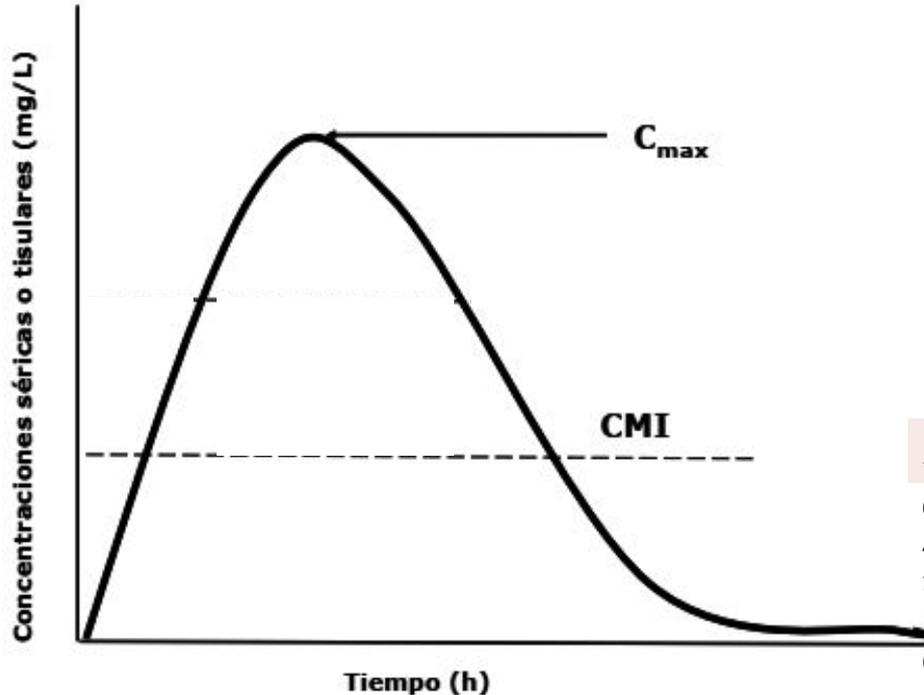
Mayor **fidelidad**
Observación al microscopio
Eliminación de células planctónicas
Costosos
Laboriosos

Modelo de biopelícula	Modelo en celda de flujo	Reactor CDC
Disponibilidad de nutrientes ^a	Sistema abierto (dinámico)	Sistema abierto (dinámico)
Formación de biopelícula	Adherencia a la superficie de vidrio de un cubre-objetos	Adherencia a cupones (policarbonato, silicona, acero inoxidable, etc)
Estudio antimicrobiano	Los antimicrobianos se añaden al bote de medio y circulan a través de la celda de flujo durante el tiempo necesario	Los antimicrobianos se añaden a la fase fluida y así todos los cupones están expuestos simultáneamente
Biomasa/recuento UFC	Despegado de las biopelículas y recolección tras lavado de los canales de vidrio en solución salina. Siembra de diluciones seriadas 1/10	Transferencia de las biopelículas por sonicación y agitación vigorosa. Siembra de diluciones seriadas 1/10
Análisis microscópico	MLC Las bacterias están marcadas previamente con PF	MEB MLC Se necesita tinción
Análisis estructural	Análisis de parámetros estructurales (biomasa, grosor, rugosidad, coeficiente de rugosidad, etc) con el <i>software</i> Comstat	Estudios de imagen 3D y viabilidad (proporción de vivos/muertos)
Características relevantes	Visualización directa y seguimiento en tiempo real no destructivo para la biopelícula Grosor de la biopelícula > 50 µm	Permite el análisis simultáneo de las bacterias en crecimiento planctónico y en biopelícula
Microorganismos estudiados	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.





PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS/FARMACODINÁMICOS (PK/PD) DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA



Farmacocinéticos: estudia la evolución de las concentraciones de los fármacos y sus metabolitos en los diferentes fluidos y tejidos del organismo a lo largo del tiempo, así como las relaciones matemáticas entre el régimen de dosificación y las concentraciones plasmáticas resultantes.

Farmacodinamia: Cuantifica la actividad de un agente antimicrobiano, que está condicionada por las concentraciones que se alcanzan en el lugar de acción, dependientes del comportamiento farmacocinético, y de la sensibilidad del microorganismo al antibiótico.

Tabla 3. Parámetros farmacodinámicos de actividad antimicrobiana sobre biopelículas

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



Commentary

Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice?

T. Coenye^{1,2,*}, D. Goeres³, F. Van Baml



Standardized biofilm models more predictive than planktonic cultures viz.

- Antibiotic activity against sessile bacteria
- Resistance and tolerance mechanisms in biofilms

Possible applications

- Drug/device registration
- Drug/device comparisons
- Support to move forward with a clinical trial
- Basic biology of biofilms



Data interpretation with **caution** due to *in vitro/in vivo* differences in biofilm biology

Modulation of drug activity by PK/PD parameters, host (e.g. immune response, host tissue) and environmental factors (e.g. oxygen, nutrients)



Not predictive of clinical success due to differences in

- Underlying biofilm biology
- Environment (flow, shear stress)
- Matrix composition
- Interplay with host

PK/PD issues limiting applicability

- Access of drugs to biofilms in deep tissues
- Effective antibiotic concentration not achievable
- Drug tolerant phenotypes

Fig. 1. Pros and cons of *in vitro* standardized biofilm models.

Estrategias de tratamiento de las infecciones asociadas a Biofilm



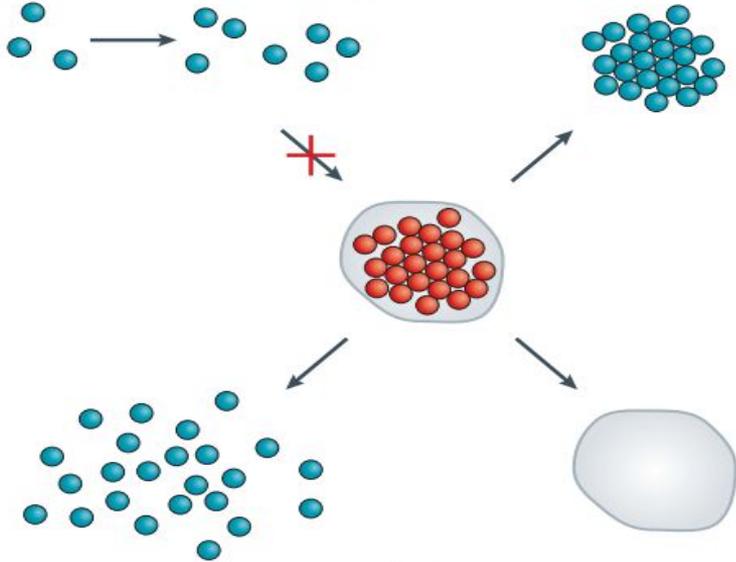
Prevention

- Antibiotic prophylaxis
- Targeting of surface molecules
- Targeting c-di-GMP signalling

Weakening

- Inhibition of efflux pumps
- Degradation of extracellular matrix
- Targeting of extracellular and intracellular signalling molecules

- Fast-growing, susceptible bacteria
- Slow-growing, tolerant bacteria
- Matrix of mature biofilm



Disruption

- Mechanical disruption
- Biological disruption with enzymes
- Targeting of extracellular and intracellular signalling molecules

Killing

- PK/PD-guided antibiotic treatment
- Targeting subpopulations with different classes of antibiotics
- Targeting of the bacterial membrane

Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed?.

Table 2. Summary of current topical antibiotic treatment regimens according to the site of biofilm infection

Biofilm site of infection	Antibiotic regimen	Duration	Route of administration	References
Lung infection in CF	0.5–2 MU colistin, twice daily	Continuous	Inhalation	(86–91)
	300 mg tobramycin, twice daily	28 days on/off cycles	Inhalation	
	112 mg tobramycin dry powder, twice daily	On/off cycles	Inhalation	
	75 mg aztreonam, three times daily	28 days on/off cycles	Inhalation	
Lung infection in non-CF bronchiectasis	32.5 mg or 65 mg ciprofloxacin, once daily	28 days	Inhalation	(92–96)
	240 mg levofloxacin, twice daily	28 days on/off cycles	Inhalation	
	1 MU colistin, twice daily	Continuous	Inhalation	
	300 mg tobramycin, twice daily	28 days	Inhalation	
Rhinosinusitis	32.5 mg ciprofloxacin, twice daily	28 days	Inhalation	(97)
	80 mg gentamicin, twice daily	Continuous	Inhalation	
	3 drops ofloxacin 0.3%, three times daily	28 days	Nasal drops	
Wounds	125 mg mupirocin + saline, twice daily	–	Rinonasal rinses	(98)
	Mupirocin 2% ointment	–	Cutaneous	(99)
	Metronidazole 0.8% gel	–	Cutaneous	(100)
Endotracheal tubes	Silver sulfadiazine 1% cream	7 days	Cutaneous	(101)
	120 mg vancomycin HCL + 2 mL saline, three times daily	14 days	Inhalation	(102)
Catheters	80 mg gentamicin + 2 mL saline, three times daily	14 days	Inhalation	(78, 103–109)
	3 mg/mL minocycline + 30 mg/mL EDTA	12–24 h	Catheter lumen	
	2 mg/mL linezolid + 2000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	2.5 mg/mL vancomycin + 2500 or 5000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	5 mg/mL cefazoline + 2500 or 5000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	10 mg/mL cotrimoxazole + 2500 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	50 mg/mL daptomycin	24 h	Catheter lumen	
	10 mg/mL tigecycline	24 h	Catheter lumen	
	10 mg/mL rifampicin	24 h	Catheter lumen	
	0.5 mg/mL ceftazidime	12–24 h	Catheter lumen	
	0.2 mg/mL ciprofloxacin + 5000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	1 mg/mL gentamicin + 2500 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	2 mg/mL liposomal amphotericin B	8–12 h	Catheter lumen	
	Minocycline-rifampin	–	Coating	
Orthopedic procedures	1 g tobramycin + 12 or 24 MU colistin + 40 g polymethylmethacrylate	–	Intraoperative (beads)	(110–113)
	40 mg/mL tobramycin + 1 g vancomycin + 10 mL packet of calcium sulfate	–	Intraoperative (beads)	
	2 mg/mL gentamicin aqueous solution	–	Intraoperative (injection)	

Ciofu O, Rojo-Molinero E, Maci a MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS* 2017; 125: 304–319.

THE BIOFILM LIFESTYLE OF UROPATHOGENS



Gracias!

¿Preguntas ?

Palma Ramos Alejandro Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos, México . IntechOpen

- Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed?.

Bjarnsholt T. Nature reviews | Drug Discovery

- Evolution of Antibiotic Resistance in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Populations Exposed to subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. Ahmed MN. AAC.

- Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. Sherrard LJ-

Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. Sherrard LJ.

Lancet. 2014.

- Antibiotic Resistance, Biofilms and Quorum Sensing in *Acinetobacter* Species. K. Prashanth. IntechOpen. 2013.

- Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Stewart PS. IJMM. 2002.

- Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Kirisits MJ. Appl Environ Microbiol. 2005.

- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas Capítulo 60. 2017.

- Análisis farmacocinético-farmacodinámico en Microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Capítulo 46. 2013.

- Combination antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, representing common and rare cystic fibrosis strains from different Irish clinics. Kapoor P. Heliyon. 2018.

- Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Macià MD. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018.

- Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice?. Coenye T. Clinical Microbiology and Infection. 2018.

- Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. Allison K. R. Curr. Opin. Microbiol. 2011.

