

BIOFILMS Y EL PROCESO DE SALUD ENFERMEDAD



Microscopia para el estudio de Biofilms bacterianos
2023

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

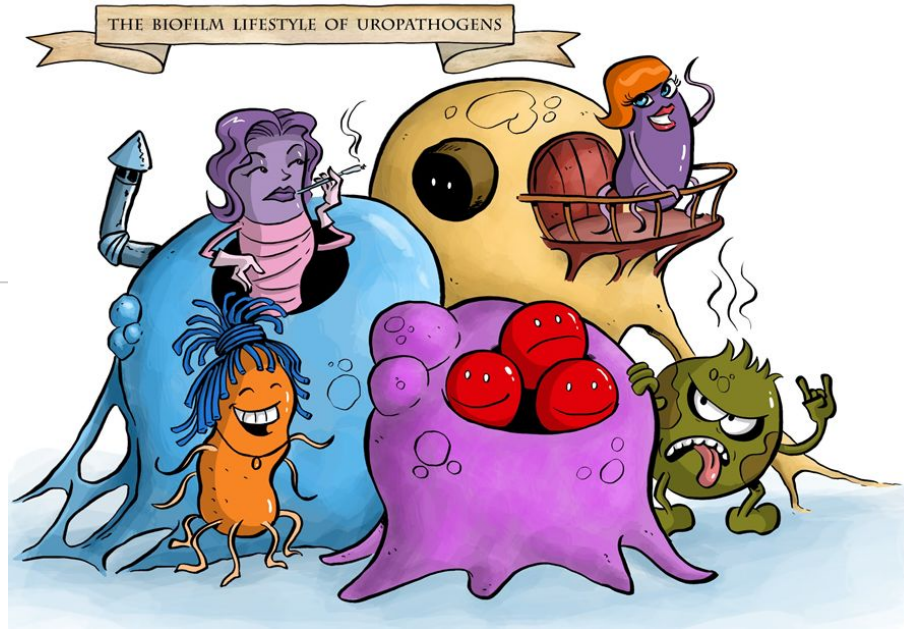
- Protegen frente a la colonización por otros patógenos exógenos. Este biofilm suele estar compuesto en una persona por 20-30 especies bacterianas distintas: *Streptococcus* y *Actinomyces* spp.



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: caries/ periodontitis
- Laringitis crónica
- Endocarditis
- Infección pulmonar en fibrosis quística
- Litiasis urinaria
- Infección del tracto biliar
- Infección urinaria
- Osteomielitis
- Infección crónica de heridas



Table 4 Microbes producing biofilms associated with medical devices

Type of implant	Microbe	Reference
Contact lenses	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Szczotka-Flynn et al. (2009), Dutta et al. (2012)
Prosthetic valve	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Mycobacterium fortuitum</i>	Wang et al. (2007), Guio et al. (2009), Bosio et al. (2012)
Urinary catheters	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Stickler (2014), Djeribi et al. (2012)
Intravascular catheters	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Candida</i> spp.	Lin et al. (2010), Singhai et al. (2012)
Prosthetic joints	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Song et al. (2013)
Pacemakers	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	Lower et al. (2011), Santos et al. (2011)
Voice prostheses	<i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida albicans</i> and <i>Candida tropicalis</i>	Elving et al. (2002), van der Mei et al. (2014)
Endotracheal tube	<i>Acinetobacter baumannii</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gil-Perotin et al. (2012), Vandecandelaere et al. (2012)



Biofilms e ITU asociada a catéter

- 4.1 millones de pacientes adquieren infecciones asociadas a los cuidados de la salud, anualmente en Europa (Wolfe et al., 2012).
- Las ITU asociadas a catéteres son las más frecuentes (Stamm & Norrby, 2001).

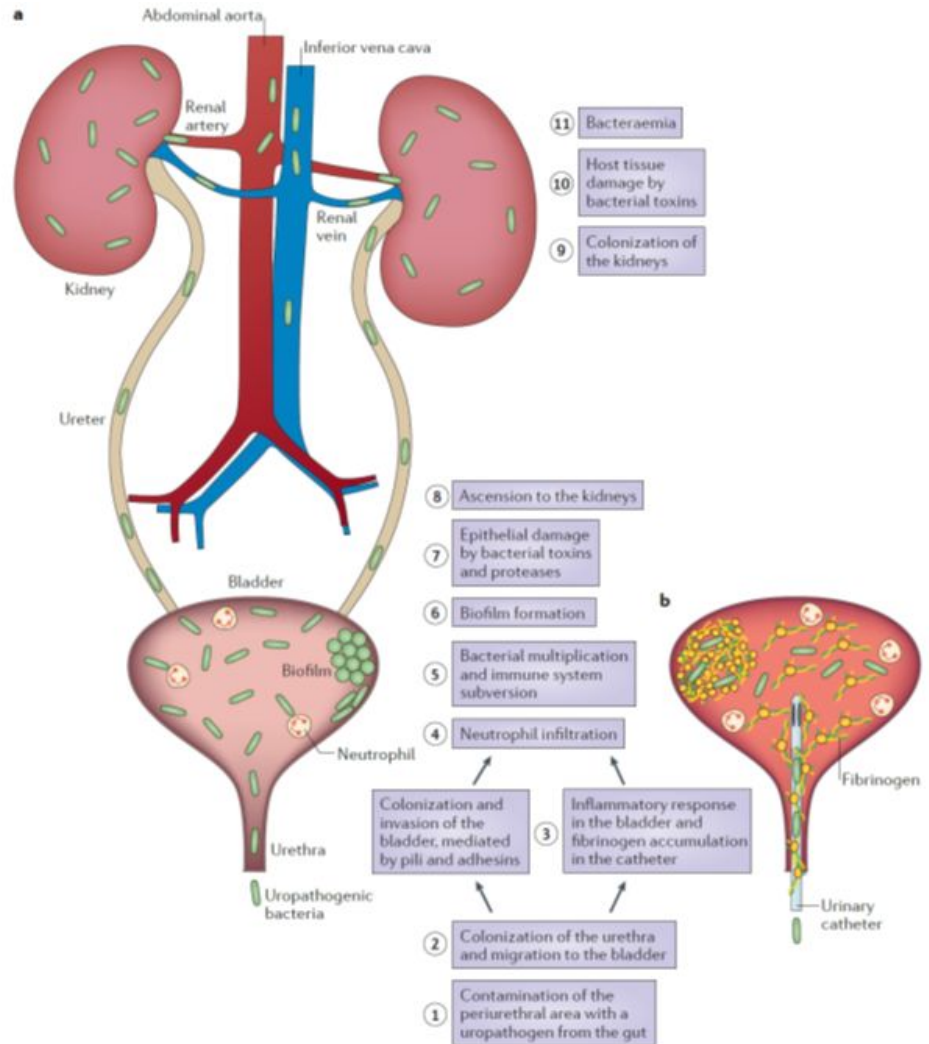


Biofilms e ITU asociada a catéter

- 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)

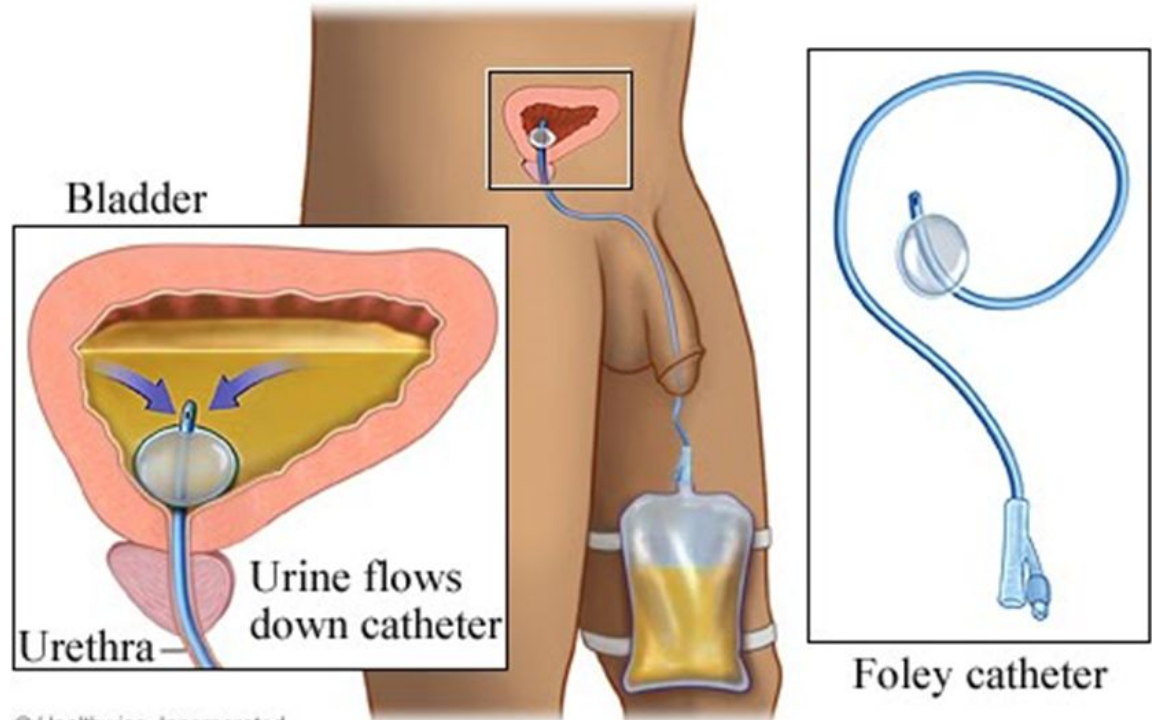


Biofilms e ITU associada a catéter



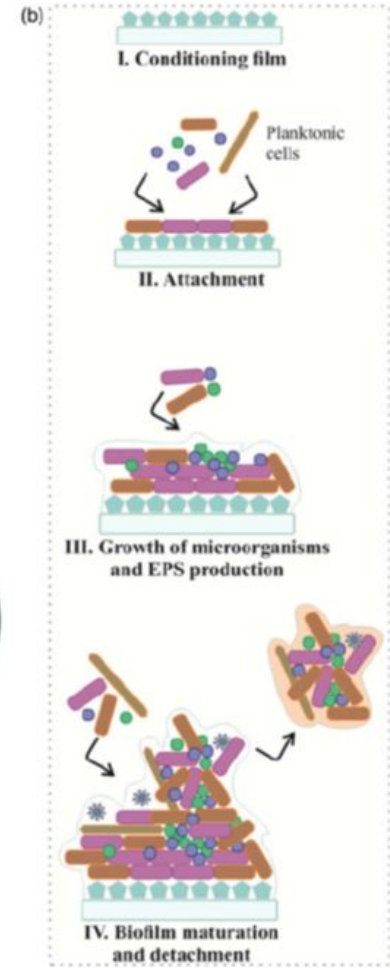
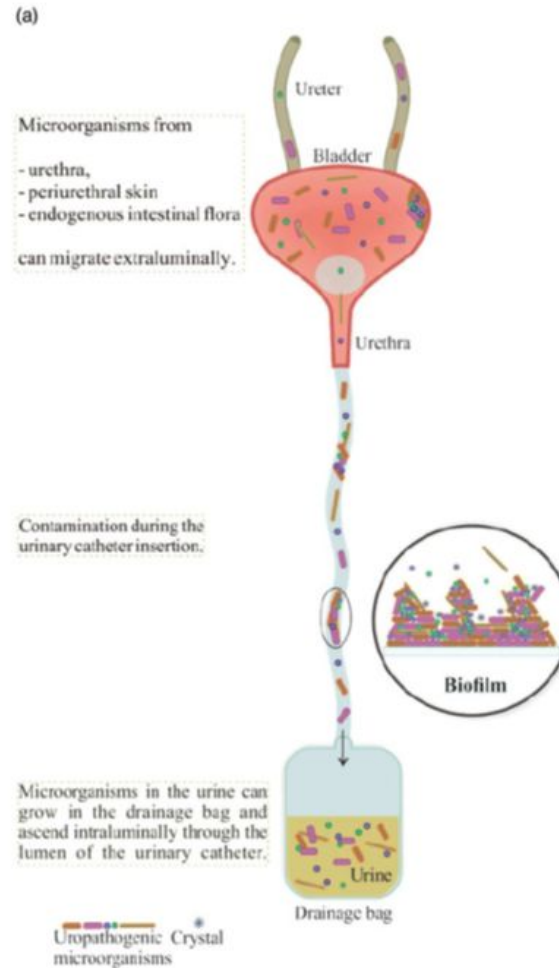


Biofilms e ITU associada a catéter



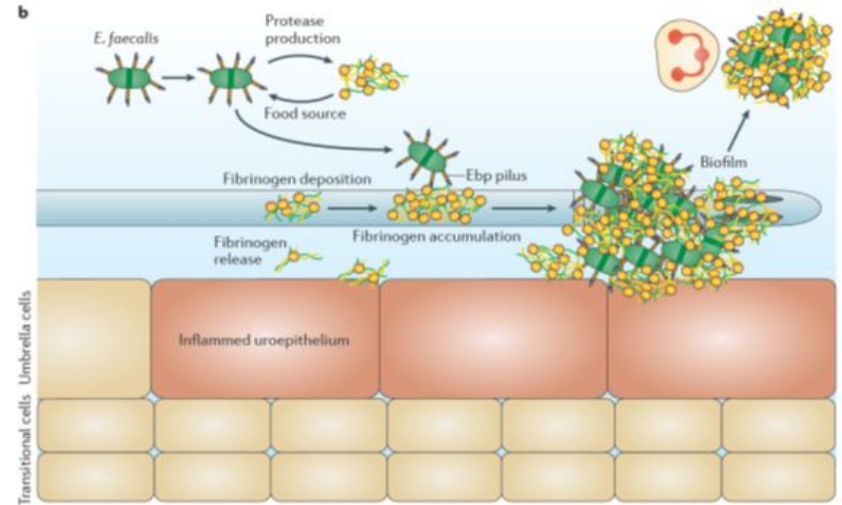
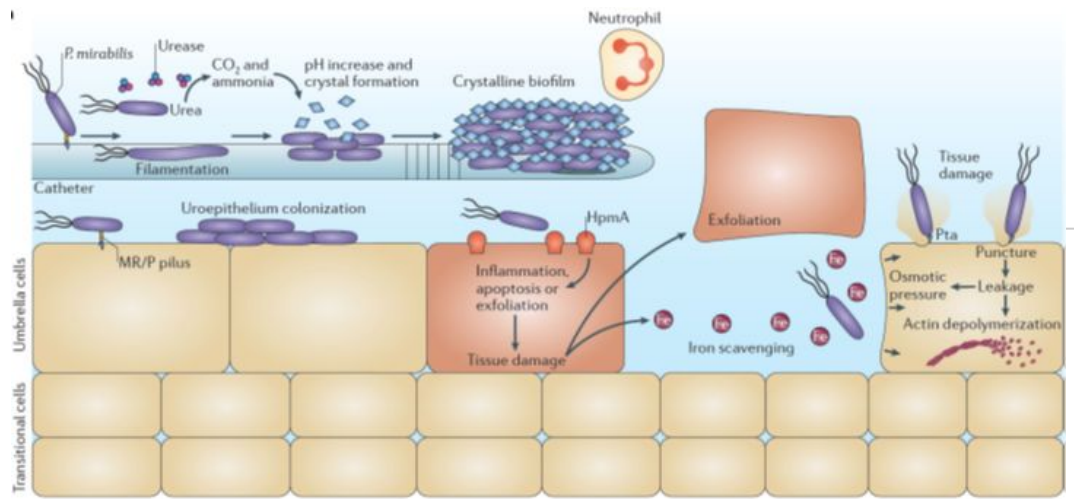


Patogénesis de la formación de biofilms sobre catéteres urinarios





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):

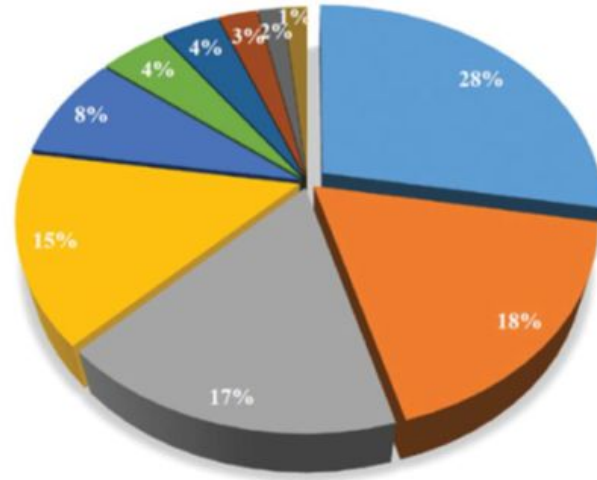
Polimicrobiano



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 de cadera
- 0,8 a 1,9% en prótesis de rodilla
- 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%

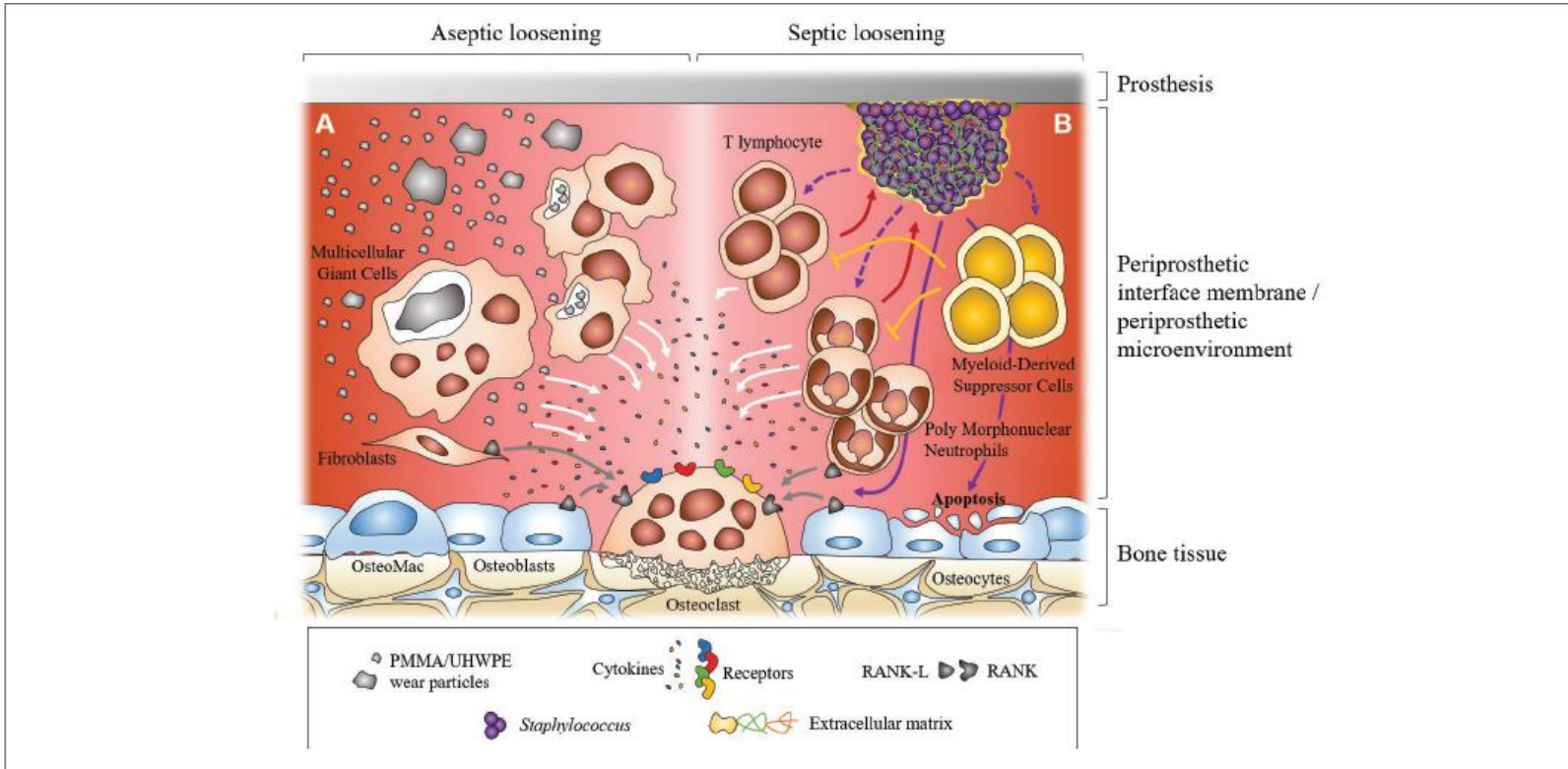
Table 1
Description of prosthetic joint infection by time from arthroplasty

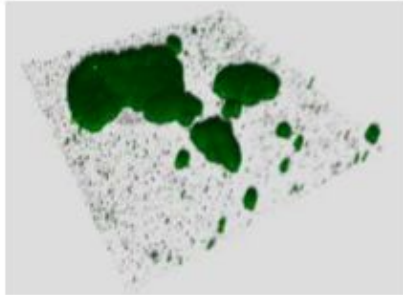
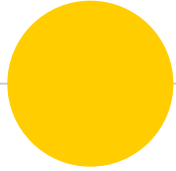
	Early Prosthetic Joint Infection	Delayed Onset (3–12 mo After Arthroplasty)	Late Onset
Synovial fluid			
White blood cell count (cells/ μ L)	>10,000	>3000	>3000
PMN (%)	>90	>80	>80
Serum CRP (mg/L)	>100 ²¹	>10	>10
Serum ESR (mm/h)	Not useful	>30	>30
Clinical presentation	Acute onset Wound drainage, fever, 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

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 sonicado	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 sonicado	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

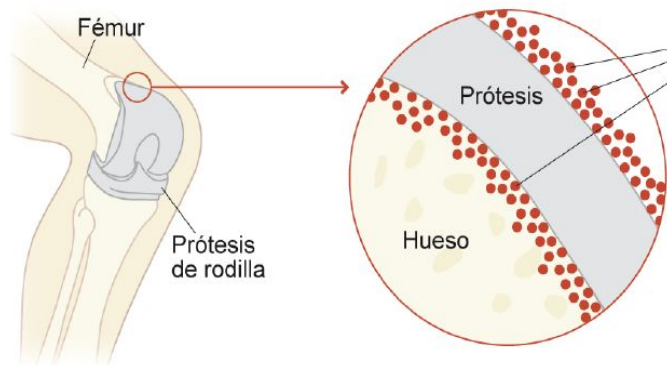
10

WAIOT GOLDEN RULES

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



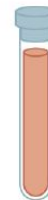
LOS BIOFILMS



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

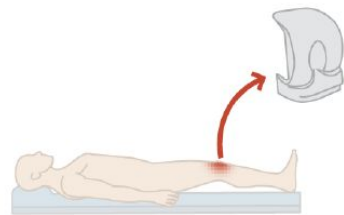


Biopsias

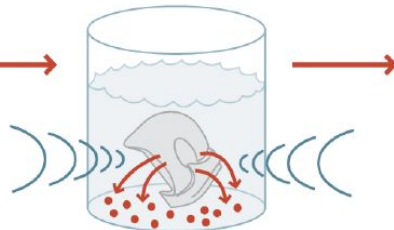
Son el procedimiento habitual, pero sólo se consigue aislar la bacteria en el 65% de los casos

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PROPUESTO

1 Extracción de la prótesis
En quirófano



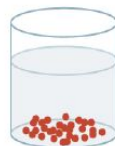
2 Sonicación
La prótesis se introduce en un recipiente y se trata con ultrasonidos para que las bacterias se separen de ella



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

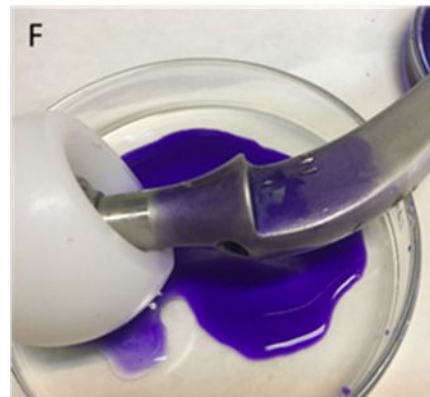
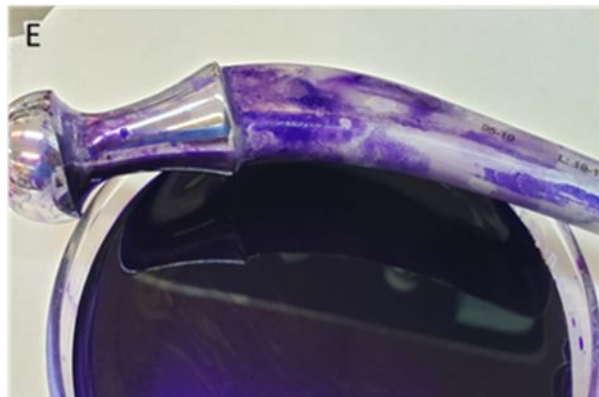
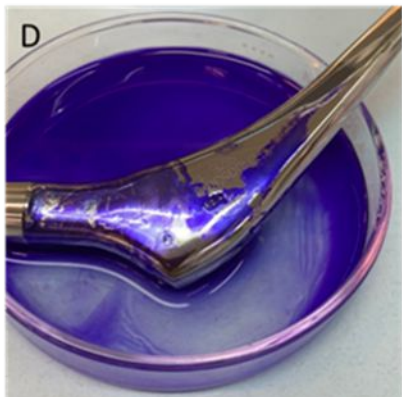
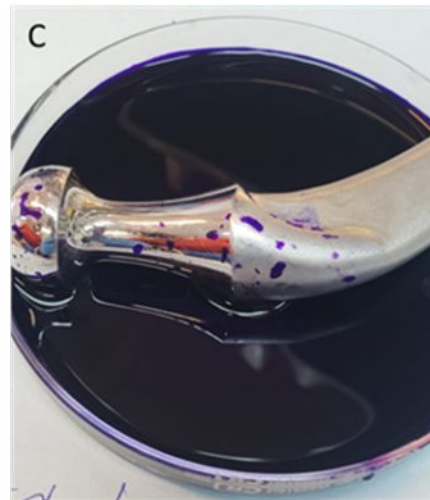
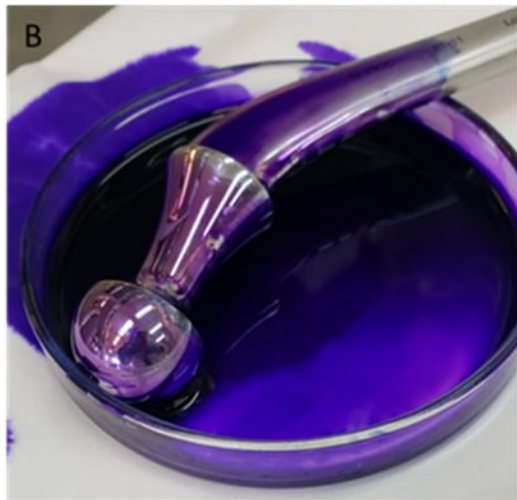
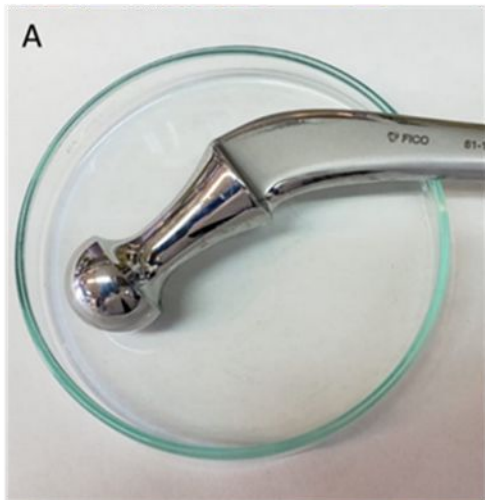
4 Tratamiento



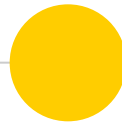
Se podría colocar una nueva prótesis sin riesgo



Antes habrá que acabar con la infección con antibióticos

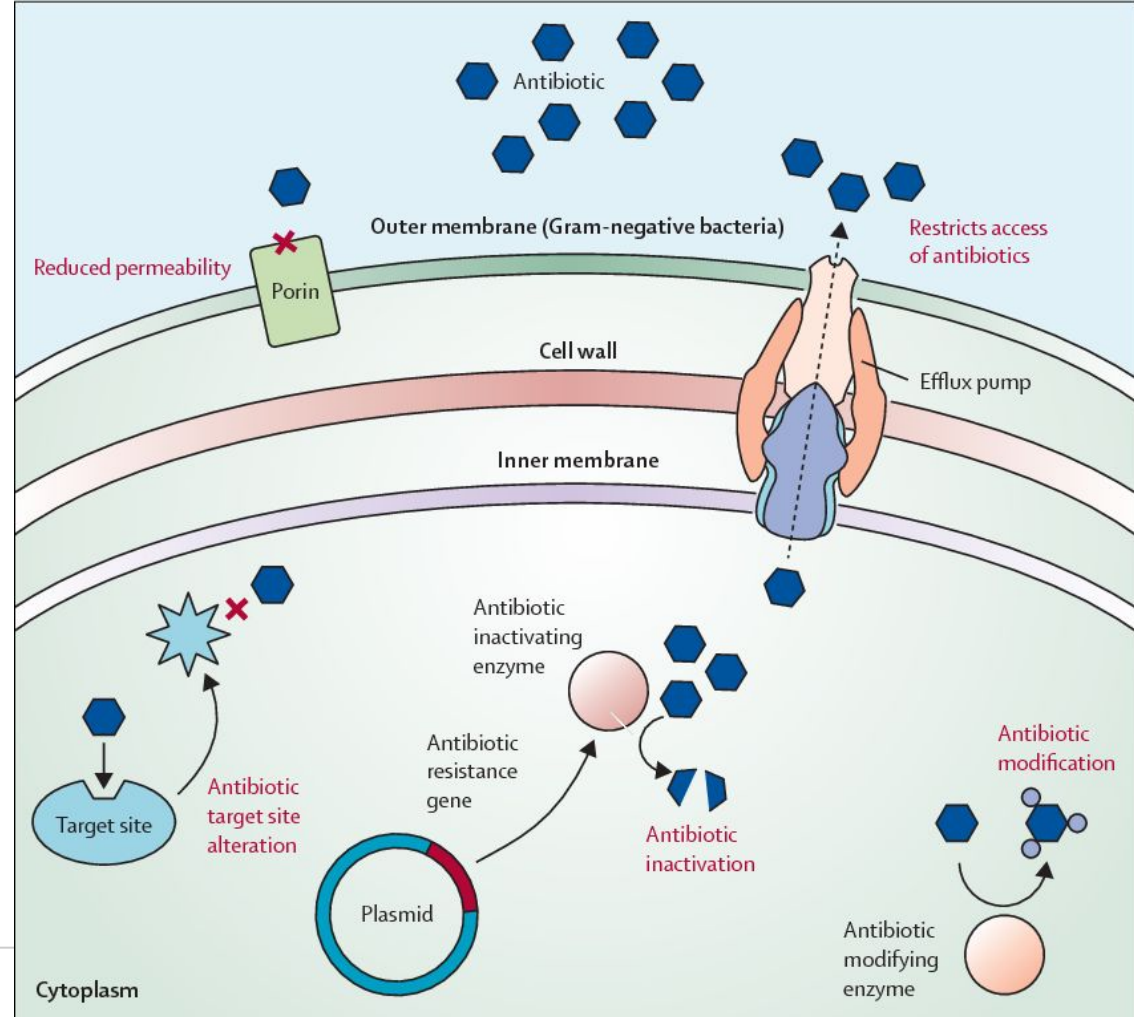


Resistencia antimicrobiana en biofilms





Mecanismos de resistencia convencionales



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

Resistencia / Tolerancia

Tolerancia física



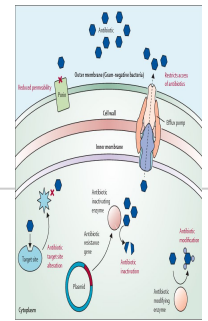
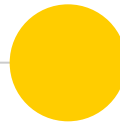
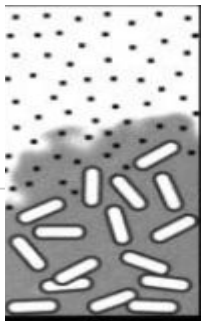
Tolerancia fisiológica



Tolerancia adaptativa



Resistencia convencional



↑ CIM 100-1000 veces

Mayor resistencia: Antibióticos, Desinfectantes y Germicidas

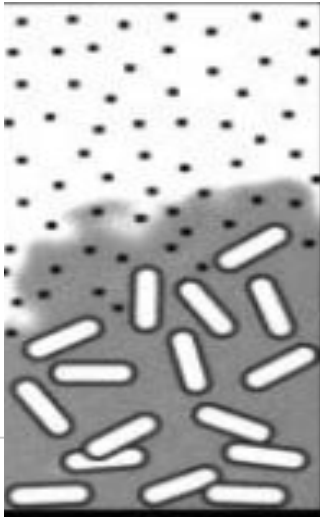




Tolerancia física



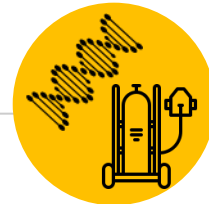
Matriz polisacarídica



Baja Penetración



Condiciones de la matriz: ADN extracelular, oxigenación



Penetración de antibióticos en la matriz

Antibiotic	Microorganism	Penetration ?
Piperacillin	<i>P. aeruginosa</i>	No
Rifampin	<i>S. epidermidis</i>	Yes
Vancomycin		Yes
Gentamicin	<i>P. aeruginosa</i>	No
Ofloxacin		Yes
Vancomycin	<i>S. epidermidis</i>	Yes
Latamoxef	<i>E. coli</i>	Yes
Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>	Yes
Levofloxacin		Yes
Ofloxacin	<i>S. epidermidis</i>	Yes
Cefotiam		Yes
Amikacin	<i>P. aeruginosa</i>	No
Ciprofloxacin		Yes
Gentamicin		No
Imipenem		Yes
Levofloxacin		Yes
Ofloxacin		Yes
Piperacillin		Yes
Sparfloxacin		Yes
Ampicillin	<i>K. pneumoniae</i>	No
Ciprofloxacin		Yes
Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>	Yes
Tobramycin		No
Rifampin	<i>S. epidermidis</i>	Yes

Table 1. Experimental measurements of antibiotic penetration into biofilms. The criterion for penetration was attainment of 30% of the applied antibiotic concentration (or 30% of the antibiotic concentration determined in a sterile control) during the test duration.

Tolerancia
fisiológica

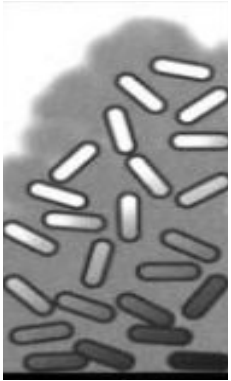
Alteración en la **tasa** de crecimiento

Cambios fisiológicos

Crecimiento lento

Superficie vs profundidad

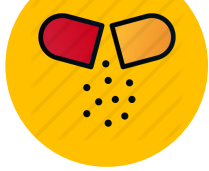
Células **persisters**



Tolerancia
adaptativa



**Genes
codificantes
de Resistencia**



Presencia de genes de
resistencia

Aumento en la **expresión**
Intercambio genético

**Tasa
de
hipermutación**

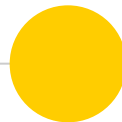


Aumento en presencia de **ATB**
Respuesta frente al stress

**Tratamientos Prolongados
concentraciones subóptimas**



Presión de **selección** ATB
Aumento de la biomasa
Inducción de la expresión de genes de
resistencia



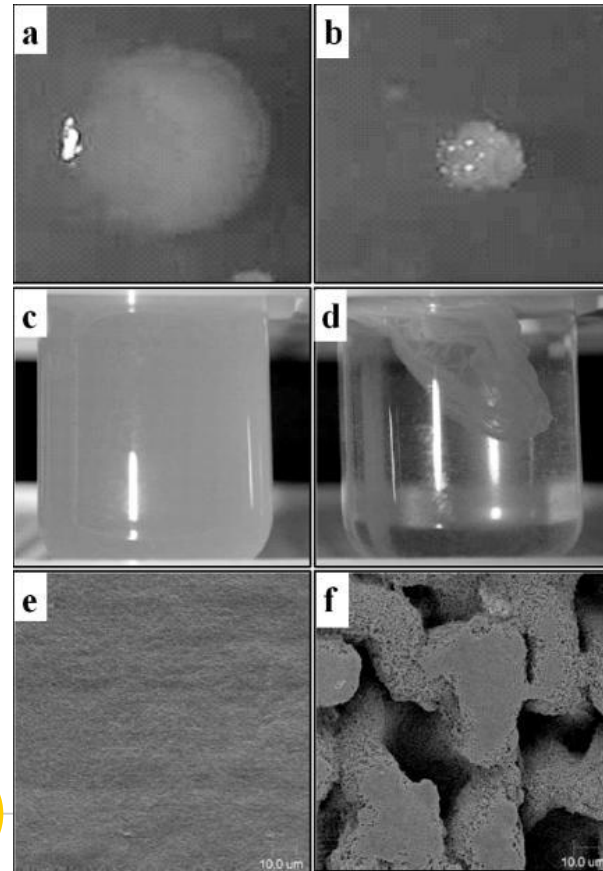


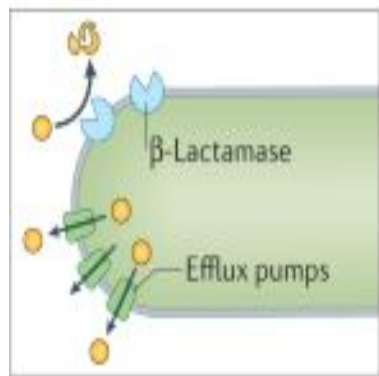
Variaciones en el tamaño

Small variant colony
Rough small-colony variant

Cambios en su **adherencia**

Interacciones
polimicrobianas





Metabolic heterogeneity

Metabolically active

- Efflux pump expression
- β -Lactamase expression

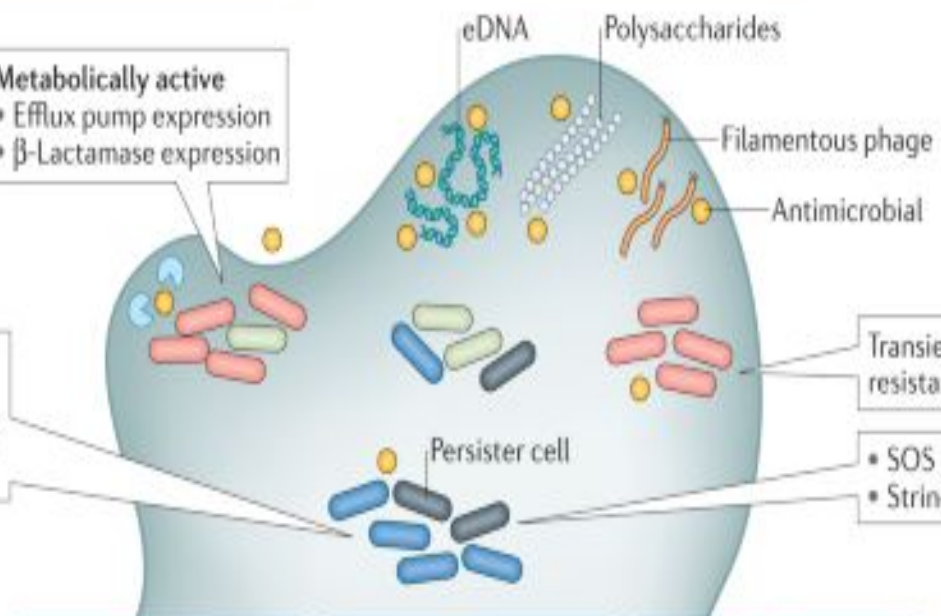
Metabolically inactive

- Reduced growth
- Decreased uptake of the antibiotic
- Depletion of antibiotic target

Bacterial phenotype

Fast growth	Mutant
Slow growth	Persister

Impaired penetration



Adaptive responses

Transient antimicrobial resistance

- SOS response
- Stringent response

Metabolic activity and oxygen concentration

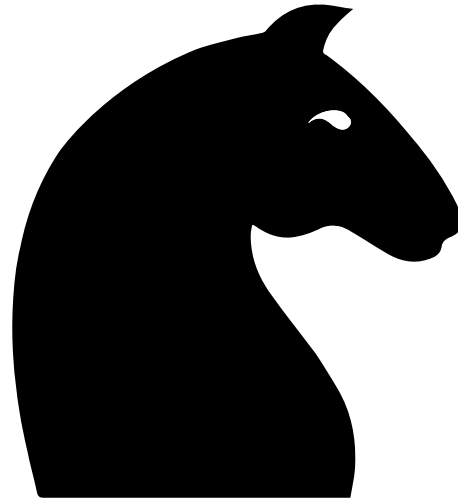
Low High



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 molecules⁹⁰ • 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

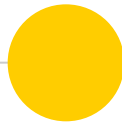
Estudios de susceptibilidad antibiótica



PLANCTÓNICA



BIOFILM



Estudios de susceptibilidad antibiótica Planctónicas

RESISTENTE
INTERMEDIA
SENSIBILIDAD

Métodos

CUALITATIVOS

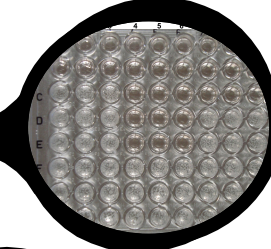
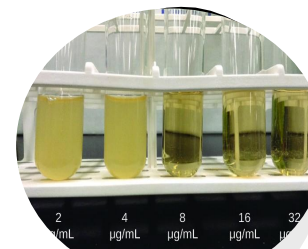
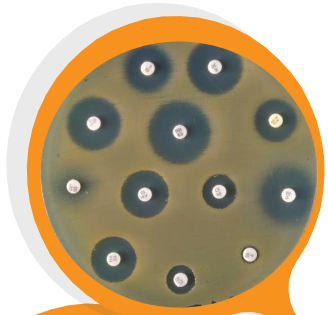
CONCENTRACION INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

CONCENTRACION BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Métodos

CUANTITATIVOS

RESISTENTE
INTERMEDIA
SENSIBILIDAD





EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases



CLSI

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

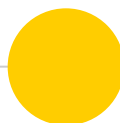
Sin contaminaciones

Destructivos

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

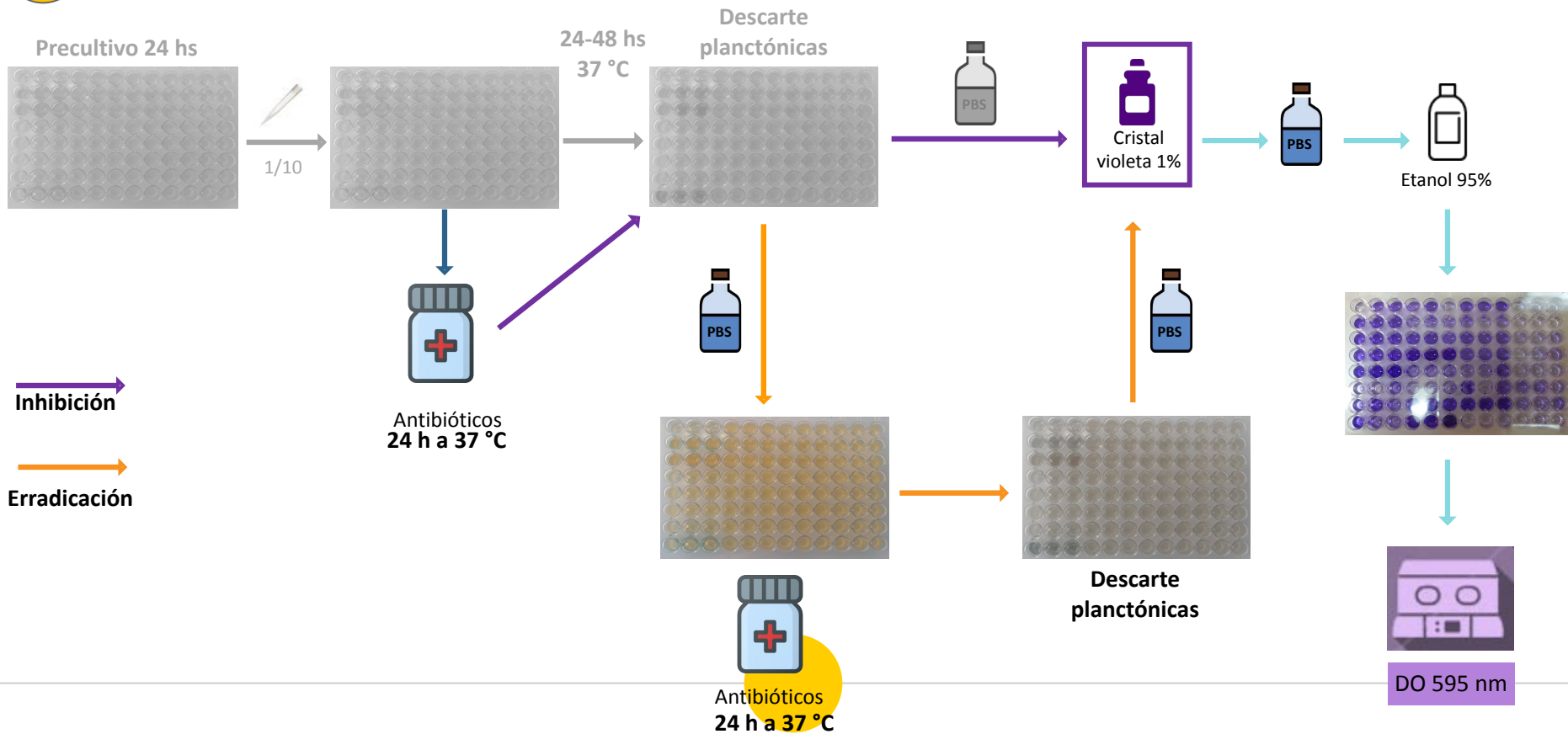
Mayor **fidelidad**
Observación al microscopio
Eliminación de células planctónicas
Costosos
Laboriosos



Modelo de biopelícula	Modelo de 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 con perlas 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



Estudios de sensibilidad en placas de microtitulación o multipocillo.

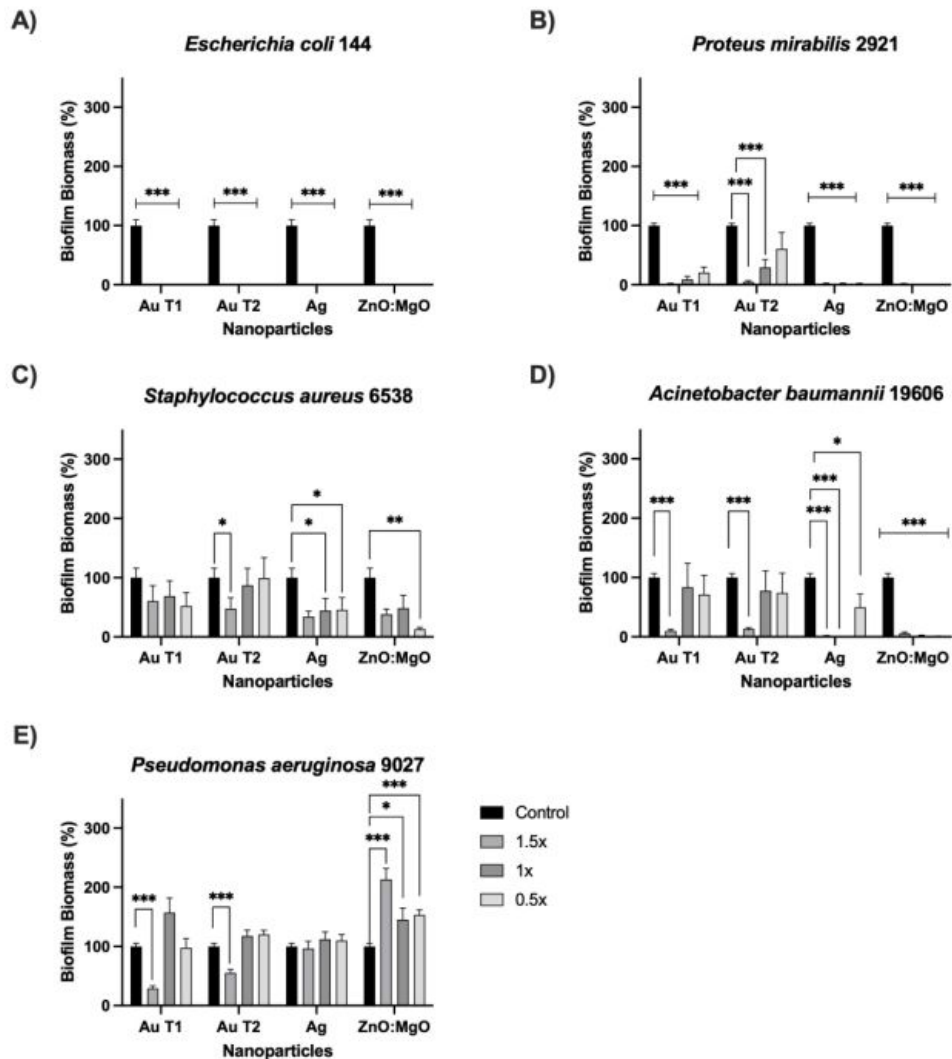


Gold-, silver- and magnesium-oxide nanoparticles prevents the formation and eradicates bacterial biofilms

Erlén Cruz Jorge¹, Nicolás Navarro Martínez^{1,2,3}, María José González Luciana Robino⁵, Javier O Morales^{2,3,4} & Paola Scavone^{*,1} 

¹Departamento de Microbiología, Laboratorio de Biofilms Microbianos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Cruz E, 2013.
DOI10.2217/nmm-2022-0239





JOURNALS
investing in science

Pathogens and Disease, 75, 2017, ftx053

doi: [10.1093/femspd/ftx053](https://doi.org/10.1093/femspd/ftx053)

Advance Access Publication Date: 12 May 2017

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection

María José González^{1,†}, Luciana Robino^{2,†}, Victoria Iribarnegaray¹, Pablo Zunino¹ and Paola Scavone^{1,*}

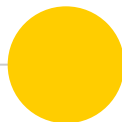


Table 5. Effect of different antibiotic concentrations on biofilm biomass in the resistant and susceptible groups.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	OD resistant strains	P-value	OD susceptible strains	P-value
Ampicillin	0	0.716 (± 0.083)		0.887 (± 0.254)	
	300	0.827 (± 0.102)	0.63	0.519 (± 0.165)	0.14
	500	0.853 (± 0.112)	0.62	0.479 (± 0.096)	0.31
	1000	0.842 (± 0.095)	0.44	0.617 (± 0.124)	0.72
Cephalothin	0	0.863 (± 0.129)		0.945 (± 0.174)	
	1200	0.857 (± 0.193)	0.45	0.641 (± 0.174)	0.0049
	1600	0.761 (± 0.159)	0.43	0.621 (± 0.139)	0.021
	2000	0.702 (± 0.127)	0.41	0.486 (± 0.114)	0.0023
Ceftriaxone	0	0.449 (± 0.152)		0.958 (± 0.130)	
	500	0.352 (± 0.341)	0.27	0.127 (± 0.026)	1.2×10^{-10}
	1000	0.327 (± 0.059)	0.19	0.114 (± 0.032)	8.2×10^{-11}
	1500	0.262 (± 0.088)	0.12	0.129 (± 0.031)	2.6×10^{-10}
Ceftazidime	0	0.461 (± 0.211)		0.967 (± 0.131)	
	500	0.257 (± 0.165)	0.17	0.096 (± 0.022)	1.6×10^{-10}
	1000	0.128 (± 0.012)	0.05	0.07 (± 0.021)	4.5×10^{-11}
	1500	0.102 (± 0.013)	0.03	0.074 (± 0.023)	5.4×10^{-11}
Amikacin	0	0.767 (± 0.147)		0.599 (± 0.099)	
	500	0.126 (± 0.035)	6.0×10^{-5}	0.135 (± 0.064)	4.7×10^{-9}
	1000	0.111 (± 0.032)	2.3×10^{-5}	0.164 (± 0.061)	8.4×10^{-8}
	2000	0.171 (± 0.067)	2.3×10^{-4}	0.161 (± 0.062)	3.9×10^{-8}
Ciprofloxacin	0	0.866 (± 0.182)		0.866 (± 0.099)	
	2	0.517 (± 0.269)	0.39	0.266 (± 0.063)	7.4×10^{-9}
	3	0.451 (± 0.295)	0.29	0.358 (± 0.078)	8.3×10^{-7}
	5	0.553 (± 0.303)	0.44	0.345 (± 0.087)	1.9×10^{-7}

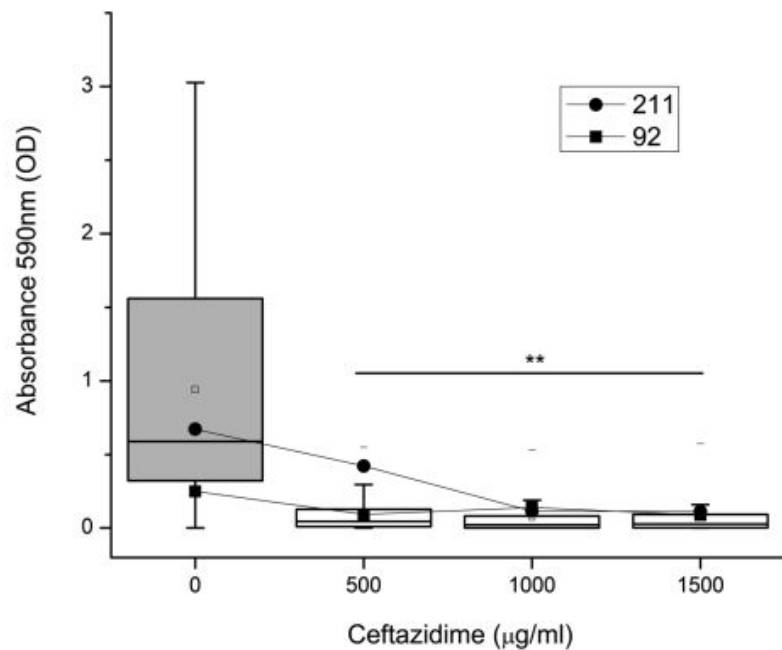


Figure 4. Biofilm quantification with different ceftazidime concentrations. Boxplot comparing the effect of ceftazidime at 0, 500, 1000 and 1500 $\mu\text{g/ml}$ concentrations on all strains and with dots and lines the resistant strains (211 and 92). Double asterisks indicate a significant reduction of the biofilm biomass versus group without antibiotics.

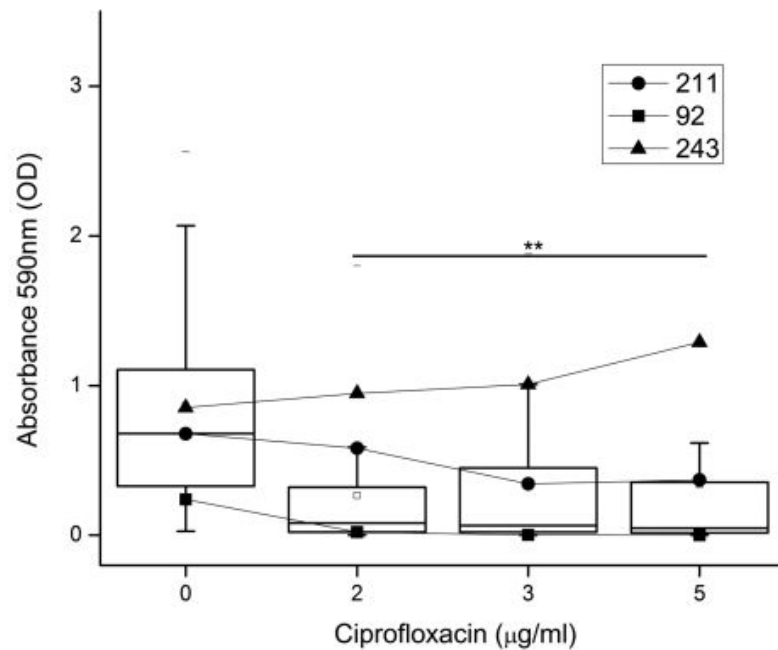


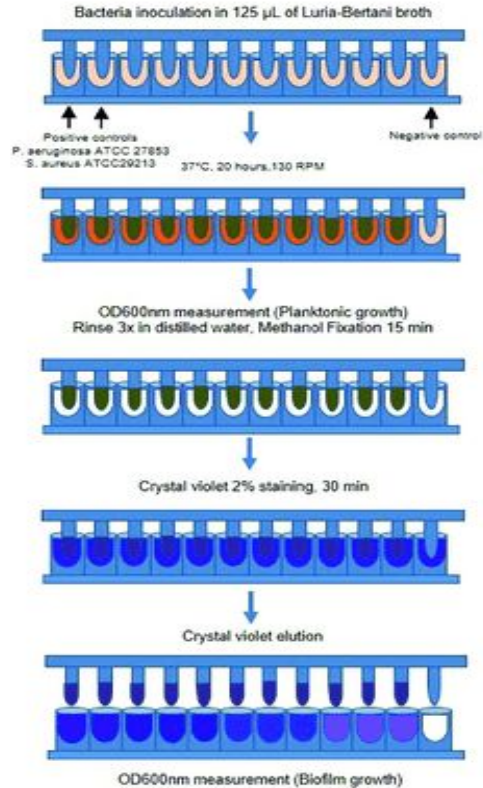
Figure 6. Biofilm quantification with different ciprofloxacin concentrations. Boxplot comparing the effect of ciprofloxacin at 0, 2, 3 and 5 $\mu\text{g/ml}$ concentrations on all strains group and with dots and lines the resistant strains (211, 92 and 243). Asterisk indicates a significant reduction of the biofilm biomass versus group without antibiotics.



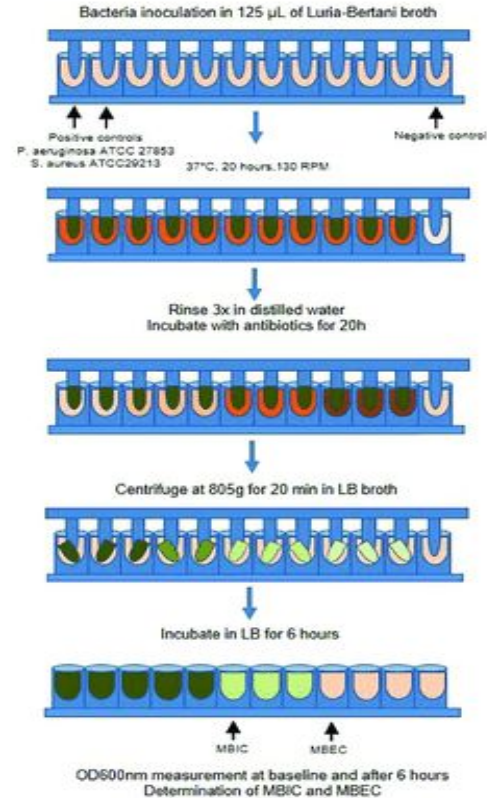
Estudios de sensibilidad en dispositivo de Calgary.



A Biofilm Formation Assay



B Biofilm Inhibition/Erradication Assay



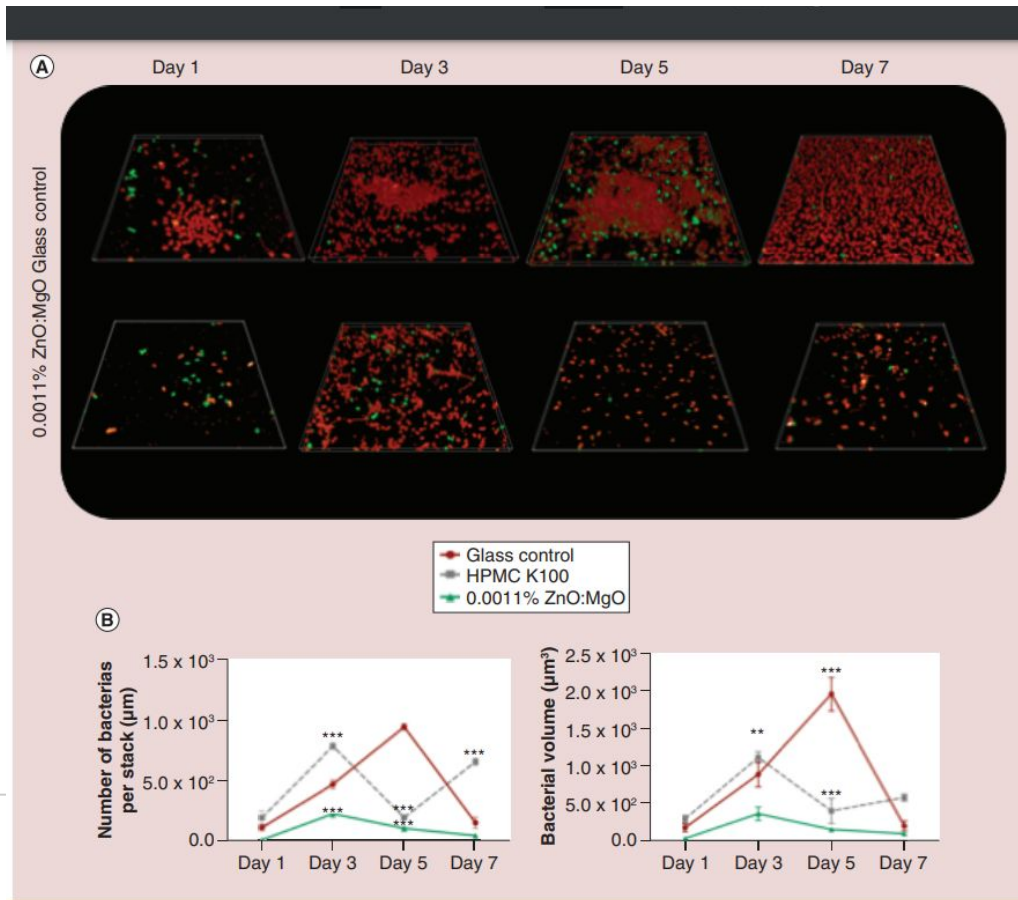
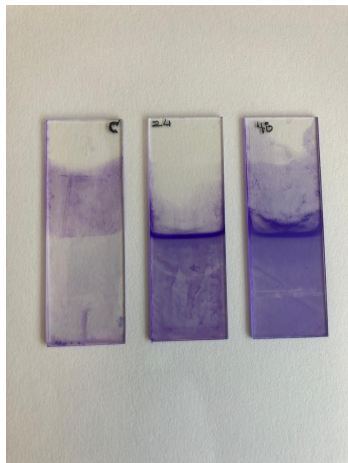
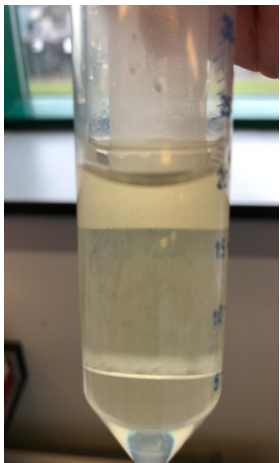


PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA SOBRE BIOFILMS

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

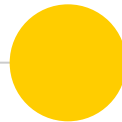
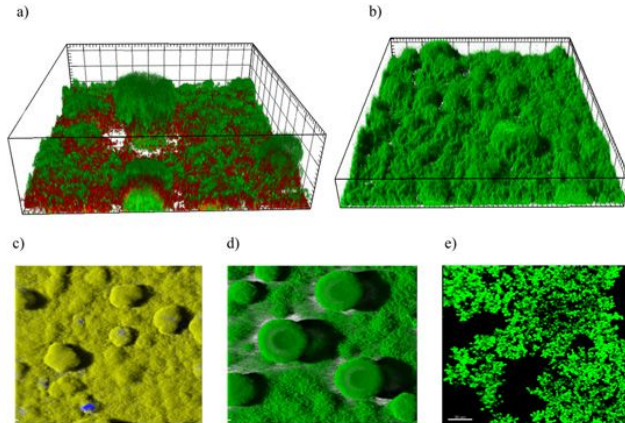
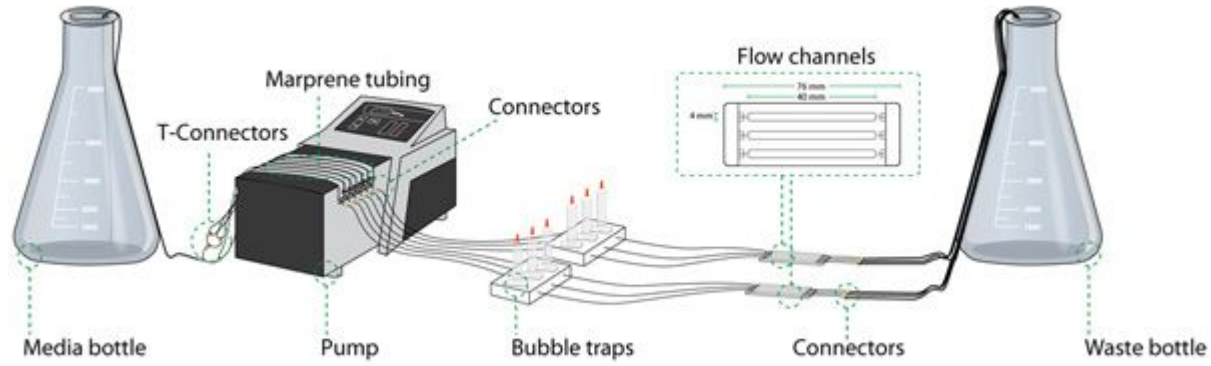


Estudios de sensibilidad estáticos en tubo con lámina



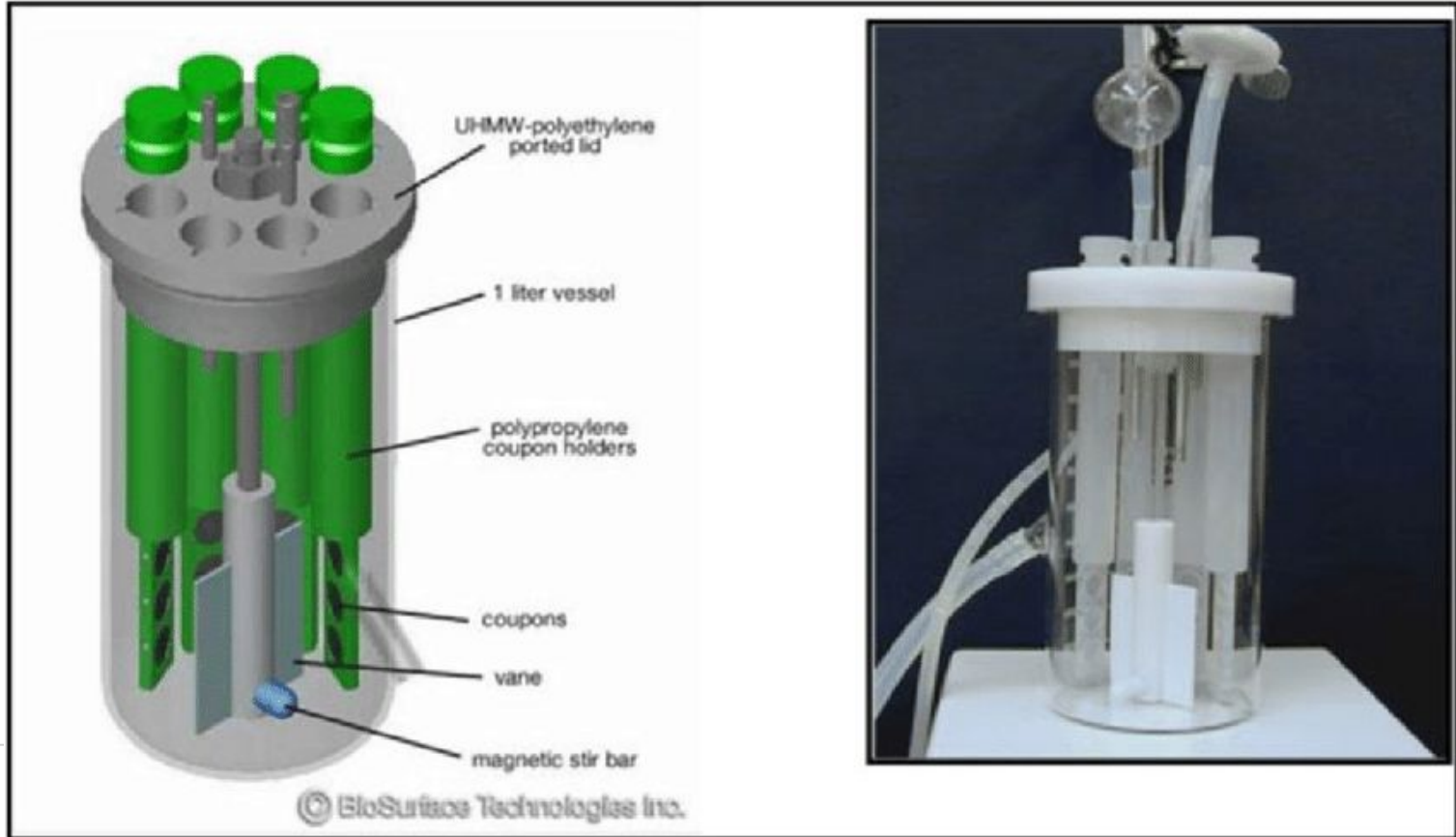


Estudios de sensibilidad en celdas de flujo



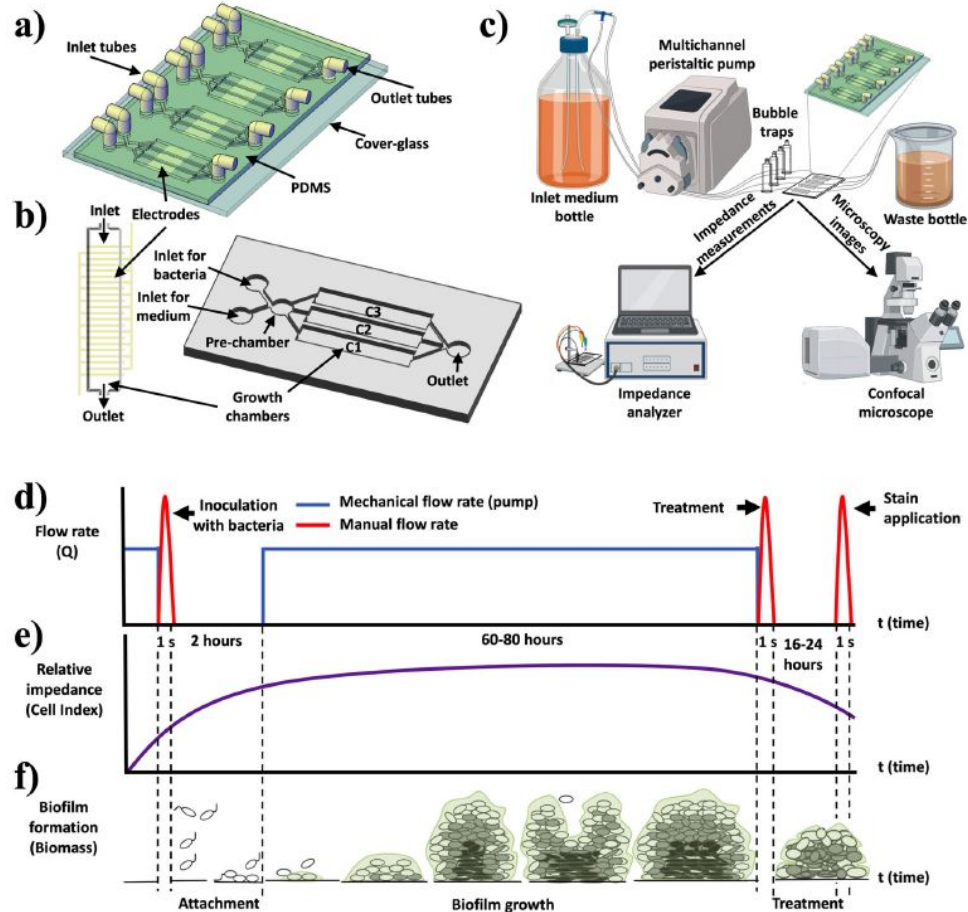


Estudios de sensibilidad en biorreactores: reactor de biopelículas CDC





Biofilm Chip device



Commentary

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

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

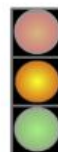


Standardized biofilm models **more predictive** than planktonic cultures viz.

- 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.

THE BIOFILM LIFESTYLE OF UROPATHOGENS



Gracias!



- *Biofilms: A Survival and Resistance Mechanism of Microorganisms* Castrillón Rivera Laura Estela and 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.

Sabino HAC, Valera FCP, Santos DV, Fantucci MZ, Titoneli CC, Martinez R, Anselmo-Lima WT and Tamashiro E (2022) Biofilm and Planktonic Antibiotic Resistance in Patients With Acute Exacerbation of Chronic Rhinosinusitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:813076. doi: 10.3389/fcimb.2021.813076



Weiss Nielsen, M., Sternberg, C., Molin, S., Regenber, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm in Flow Cells. *J. Vis. Exp.* (47), e2383, doi:10.3791/2383 (2011).

Blanco-Cabra, N., López-Martínez, M.J., Arévalo-Jaimes, B.V. *et al.* A new BiofilmChip device for testing biofilm formation and antibiotic susceptibility. *npj Biofilms Microbiomes* 7, 62 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00236-1>

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.

Persister cells. Lewis, K. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010.

Jorge EC, Martínez NN, González MJ, Sánchez SV, Robino L, Morales JO, Scavone P. Gold-, silver- and magnesium-doped zinc oxide nanoparticles prevents the formation of and eradicates bacterial biofilms. *Nanomedicine (Lond).* 2023 May 31. doi: 10.2217/nnm-2022-0239. Epub ahead of print. PMID: 37254888.

