

# ***BIOFILMS***

## **EN LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS CRÓNICAS: FQ, EPOC Y BRONQUIECTASIAS**

**Dra. María Dolores Macià**  
**Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Son Espases  
e Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa)**

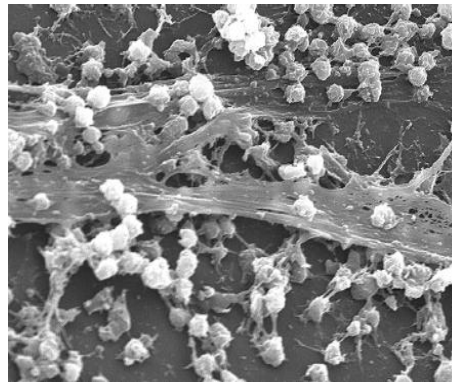
# INTRODUCCIÓN

## *Biofilms:*

- ▶ Agrupación celular adherida a superficie sólida en matriz de exopolisacárido
- ▶ Ubicuos todas superficies (materiales naturales, metales, plásticos, implantes, plantas, tejidos cuerpo humano)



Placa dental



*Biofilm* por  
*Staphylococcus aureus* en  
la superficie de un catéter



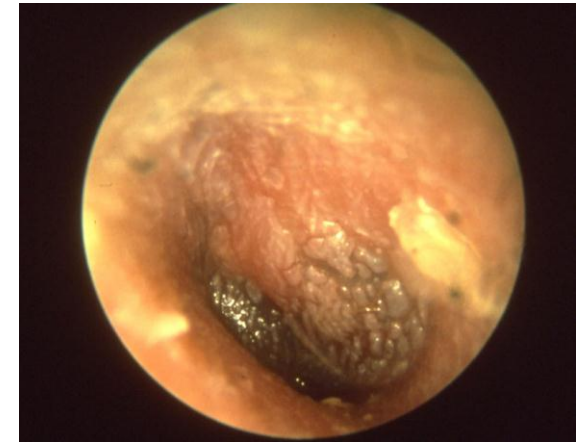
*Biofilm* en alga  
verde en  
Yellowstone National park

# IMPORTANCIA CLÍNICA

- ▶ Gran variedad de infecciones
- ▶ **PERSISTENCIA** (infecciones crónicas)

Table 1. Partial list of human infections involving biofilms.

Infection or disease	Common biofilm bacterial species
Dental caries	Acidogenic Gram-positive cocci (e.g., <i>Streptococcus</i> )
Periodontitis	Gram-negative anaerobic oral bacteria
Otitis media	Nontypable strains of <i>Haemophilus influenzae</i>
Musculoskeletal infections	Gram-positive cocci (e.g., staphylococci)
Necrotizing fasciitis	Group A streptococci
Biliary tract infection	Enteric bacteria (e.g., <i>Escherichia coli</i> )
Osteomyelitis	Various bacterial and fungal species—often mixed
Bacterial prostatitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative bacteria
Native valve endocarditis	Viridans group streptococci
Cystic fibrosis pneumonia	<i>P. aeruginosa</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Nosocomial infections	
ICU pneumonia	Gram-negative rods
Sutures	<i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Exit sites	<i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Arteriovenous shunts	<i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Schleral buckles	Gram-positive cocci
Contact lens	<i>P. aeruginosa</i> and Gram-positive cocci
Urinary catheter cystitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative rods
Peritoneal dialysis (CAPD) peritonitis	A variety of bacteria and fungi
IUDs	<i>Actinomyces israelii</i> and many others
Endotracheal tubes	A variety of bacteria and fungi
Hickman catheters	<i>S. epidermidis</i> and <i>C. albicans</i>
Central venous catheters	<i>S. epidermidis</i> and others
Mechanical heart valves	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>
Vascular grafts	Gram-positive cocci
Biliary stent blockage	A variety of enteric bacteria and fungi
Orthopedic devices	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>
Penile prostheses	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>



# IMPORTANCIA CLÍNICA

## ▶ Infección crónica de herida

- > 60%

- Un tipo o más de microorganismos

- *Staphylococcus aureus* / *Pseudomonas aeruginosa*



## ▶ Implantes, prótesis, catéteres, tubos endotraqueales, válvulas cardíacas

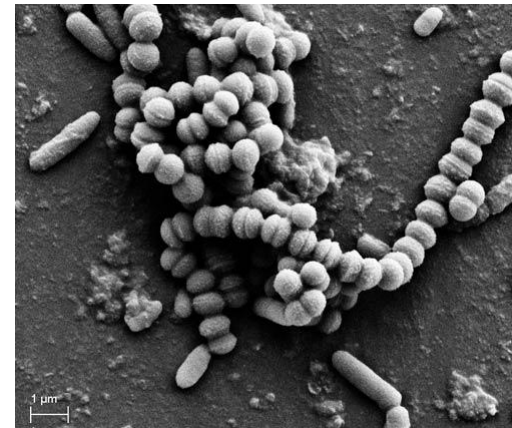
- *S. aureus* / *S. epidermidis* / *S. viridans*

- Infecciones secundarias

## ▶ Neumonía asociada a ventilación mecánica

- *P. aeruginosa*

- 1 / 3 de pacientes intubados



▶ Infección respiratoria crónica en fibrosis quística (FQ)

# INFECCIÓN RESPIRATORIA CRÓNICA (IRC) por *P. aeruginosa* (FQ, EPOC, bronquiectasias)

- CAMBIOS FISIOLÓGICOS

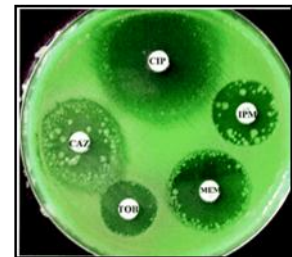
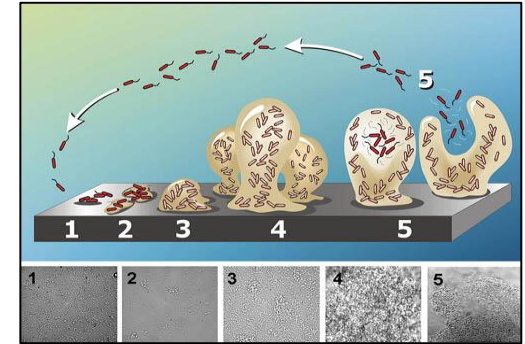
(Modo de crecimiento en *biofilm*)

- SELECCIÓN DE MUTACIONES ADAPTATIVAS

- **Hiperproducción de alginato**, scv, auxotrofia, alteraciones LPS, pérdida del flagelo, etc.

- ALTA PREVALENCIA DE CEPAS **HIPERMUTADORAS** EN IRC

- Resistencia a los antibióticos
- Mayor frecuencia de mutaciones adaptativas



# ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN

**Biofilms:** canales de nutrientes; organización funcional y distinta expresión génica.

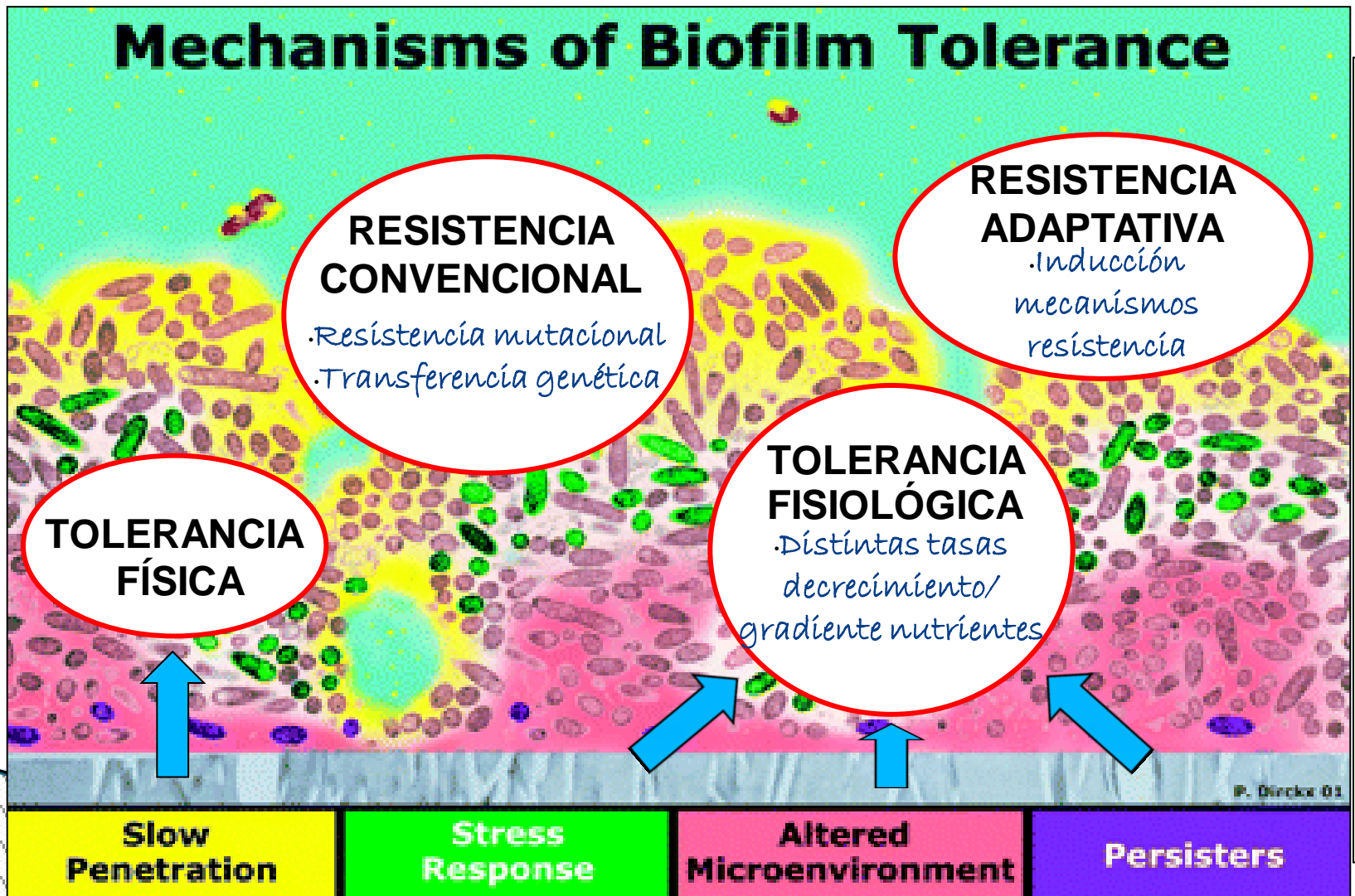
1. Adhesión a la superficie (flagelo y pili tipo IV)
2. Transcripción de genes específicos + *quorum sensing* (QS)



**Defensa** de las agresiones medioambientales

- Resistencia al **sistema inmunitario**
- Resistencia a los **antibióticos**

# RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN *BIOFILM*



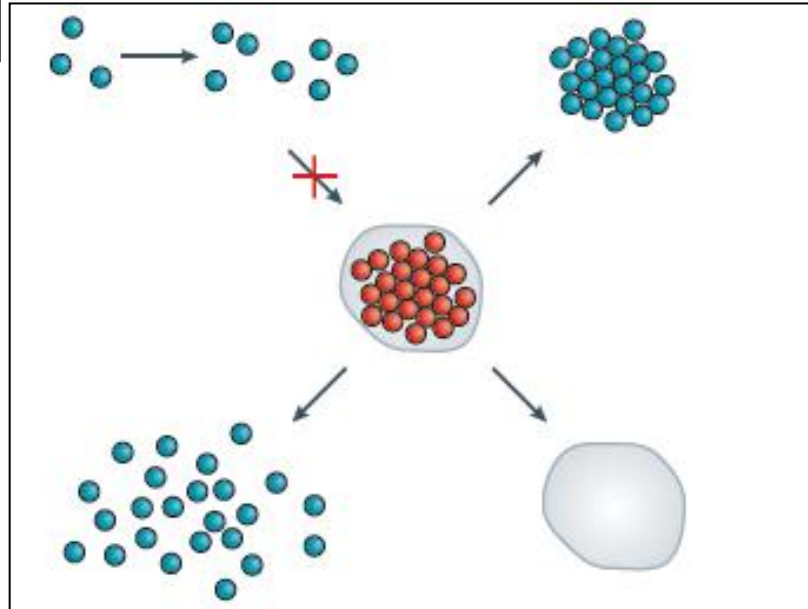
# ESTRATEGIAS ANTI-BIOFILM

## PREVENCIÓN

- Profilaxis

## DISRUPCIÓN

- Disrupción mecánica
- Disrupción enzimática



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

## DEBILITAMIENTO

- Inhibición de bombas de expulsión
- Degradación matriz
- Interferencia con moléculas de señalización

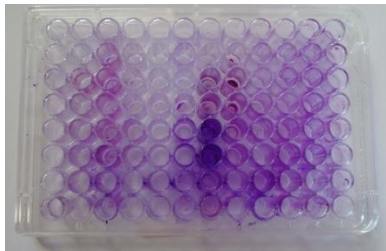
## KILLING

- Terapias guiadas según PK/PD
- Terapias dirigidas a diferentes subpoblaciones/áreas

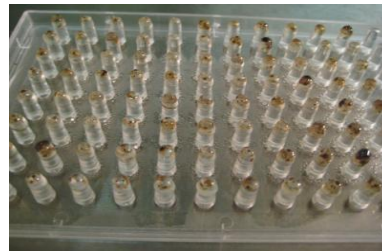


# MODELOS DE ESTUDIO DE *BIOFILMS* *IN VITRO*

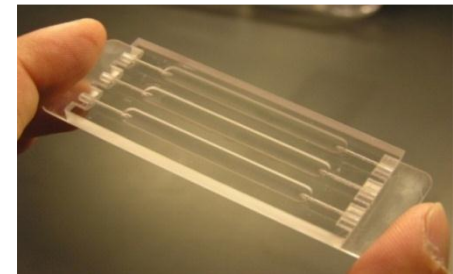
Se han desarrollado diferentes modelos de *biofilms* in vitro que se han estudiado con numerosas especies bacterianas



Placas  
microtitrer



Dispositivo de Calgary



Celda de flujo



Biorreactores

# MODELO DE *BIOFILM* EN DISPOSITIVO DE CALGARY

- Sistema cerrado (**estático**)
- Adherencia “*peg lid*”
- *Biofilms* en *pegs* se incuban con los antibióticos
- Transferencia por centrifugación o sonicación. Medida DO 650 nm
- **Fácil y reproducible, bajo riesgo de contaminación**
- SEM. CLSM. **Fijación y tinción destructivas para los *biofilms***
  - **Grosor < 50  $\mu\text{m}$**



Ceri *et al.* JCM 1999  
Moskowitz *et al.* AAC 2004

# PARÁMETROS DE ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LOS *BIOFILMS* (Dispositivo de Calgary)

Parámetro	Abreviatura	Definición
Concentración mínima inhibitoria	MIC	Mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento visible de un cultivo planktónico tras incubación <i>overnight</i>
Concentración mínima inhibitoria del <i>biofilm</i>	MBIC	Mínima concentración de antibiótico que resulta en una diferencia a DO 650nm $\leq 10\%$ (1 Log diferencia en crecimiento tras 6 h de incubación) de la media de dos pocillos controles positivos
Concentración mínima bactericida	MBC	Mínima concentración de antibiótico que reduce en un 99.9% las UFC respecto al inóculo inicial de un cultivo planktónico
Concentración bactericida del <i>biofilm</i>	BBC	Mínima concentración de antibiótico que reduce en un 99.9% las UFC del <i>biofilm</i> respecto al control positivo de crecimiento
Concentración de erradicación del <i>biofilm</i>	MBEC	Mínima concentración de antibiótico que previene el crecimiento visible en el medio de recolección del <i>biofilm</i>
Concentración de prevención del <i>biofilm</i>	BPC	Igual que la MBIC pero la inoculación bacteriana y la exposición al antibiótico ocurren simultáneamente

# ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LOS *BIOFILMS*

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2004, p. 1915-1922  
0095-1137/04/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.42.5.1915-1922.2004  
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 42, No. 5

Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of  
*Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis

Samuel M. Moskowitz,<sup>1,2</sup> Jessica M. Foster,<sup>3</sup> Julia Emerson,<sup>1,2</sup> and Jane L. Burns<sup>1,3\*</sup>

- Valores similares de MIC y BIC para amikacina, ciprofloxacino, y tobramicina
- Las **BICs** de los antibióticos  **$\beta$ -lactámicos** fueron **mucho más altas que las MICs**
- **Azitromicina** bastante activa frente a los *biofilms* de *P. aeruginosa*

TABLE 3. Comparison of biofilm and standard susceptibility testing of *P. aeruginosa* isolates for group 1 agents

Antibiotic (no. of strains) <sup>a</sup>	Concn ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	BIC			MIC		
	BIC <sub>50</sub>	BIC <sub>90</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range
Amikacin (90)	32	256	4-→256	16	128	≤0.5-→128
<b>Azithromycin (90)</b>	<b>2</b>	<b>32</b>	<b>≤0.5-→32</b>	NA	NA	NA
Aztreonam (85)	>128	>128	≤2-→128	4	32	≤2-→64
Ceftazidime (88)	128	>128	≤2-→128	2	16	≤0.5-512
Ciprofloxacin (90)	0.5	4	<0.25-→16	1	4	≤0.25-16
Clarithromycin (90)	32	>32	≤0.5-→32	NA	NA	NA
Doxycycline (86)	>64	>64	≤1-→64	16	32	≤1-→32
Gentamicin (90)	16	>64	≤1-→64	8	>32	≤1-→32
Meropenem (87)	4	64	≤1-→64	≤1	8	≤1-16
Piperacillin-tazobactam <sup>b</sup> (85)	256	>512	≤16-→512	4	128	≤1-1,024
Ticarcillin-clavulanate <sup>b</sup> (72)	512	>512	≤16-→512	16	256	≤2-→4,096
Tobramycin (92)	4	32	≤1-→64	2	32	≤0.25-→512

<sup>a</sup> A total of 94 strains were tested.

<sup>b</sup> For standard susceptibility testing (MIC) of the  $\beta$ -lactam and  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, only the  $\beta$ -lactam (without inhibitor) was tested. However, the MIC values should predict results for the combination.

# ACTIVIDAD DE LA AZITROMICINA (AZM) SOBRE LOS *BIOFILMS* DE *P. aeruginosa*

No presenta actividad in vitro (MICs >128 µg/ml) pero:

- Actividad **bactericida** en fase estacionaria
- **Inhibición** del sistema **QS**
- **Inhibición** de la formación del **biofilm**
- **Reducción** de la expresión de los factores de **virulencia** dependientes de QS
- **Reducción** de la producción de **alginato**
- Propiedades **antiinflamatorias**
- **Beneficio clínico** de la terapia de **mantenimiento**
- **Ampliamente usado** en la actualidad (53.6%, CFF 2005)

# ACTIVIDAD DE AZM SOBRE LOS *BIOFILMS* DE *P. aeruginosa*

- ¿Presión selectiva de cara a la selección de mutantes resistentes?
- ¿Influencia de los fenotipos hipermutador y mucoide?
- ¿Mecanismos de resistencia?
- ¿Resistencia cruzada a los agentes anti-pseudomónicos convencionales?
- Estudiamos el efecto individual y combinado de la hipermutación e hiperproducción de alginato sobre la actividad bactericida y el desarrollo de resistencia a AZM en *biofilms in vitro* de *P. aeruginosa*

# ACTIVIDAD DE AZM SOBRE LOS *BIOFILMS* DE *P. aeruginosa*

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2009, p. 1552-1560  
0066-4804/09/\$08.00+0 doi:10.1128/AAC.01264-08  
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 53, No. 4

## Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Bactericidal Activity and Selection of *nfxB* Mutants<sup>∇</sup>

Xavier Mulet, María D. Maciá, Ana Mena, Carlos Juan, José L. Pérez, and Antonio Oliver\*

Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Son Dureta, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud, Palma de Mallorca, Spain

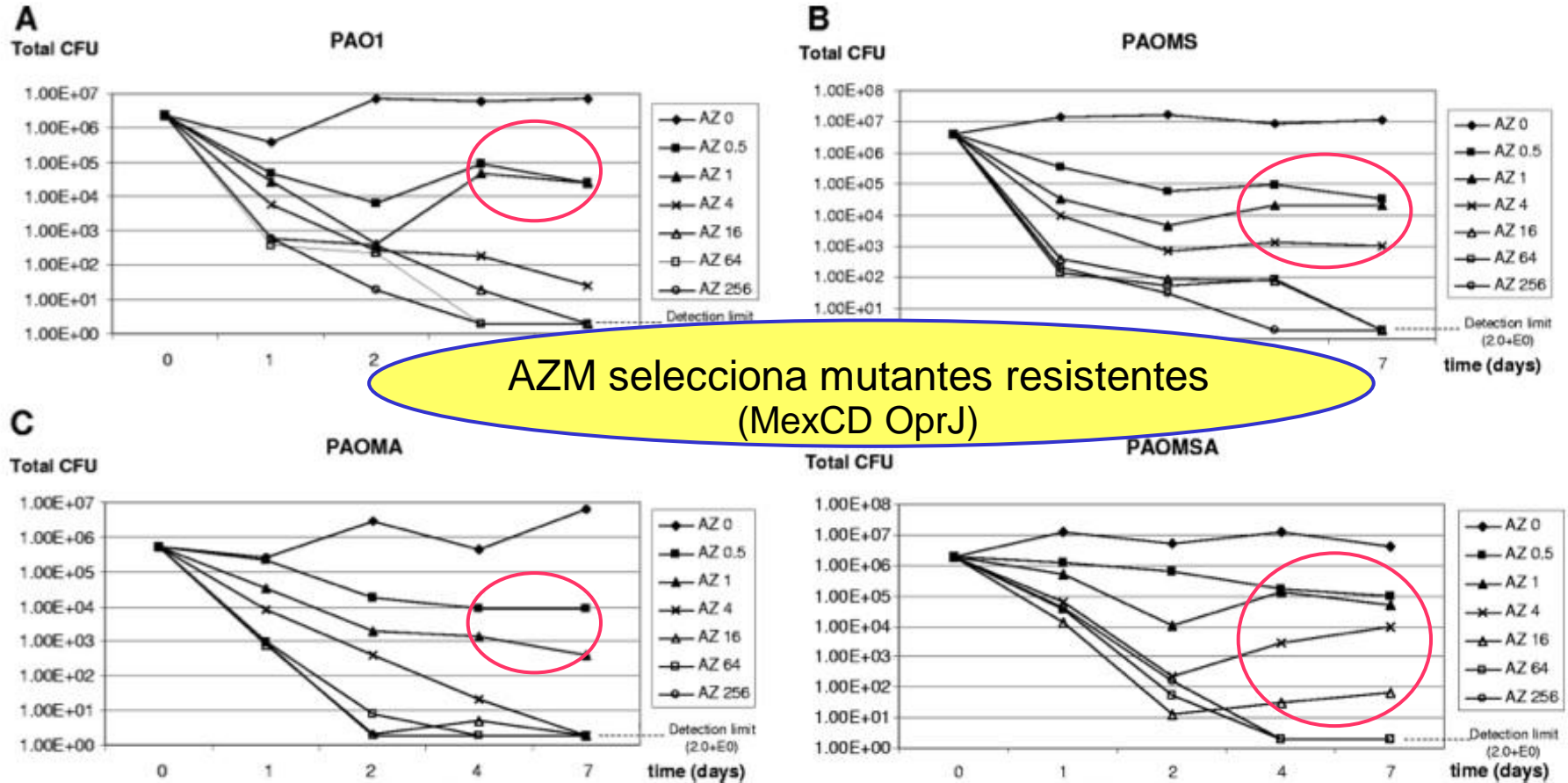
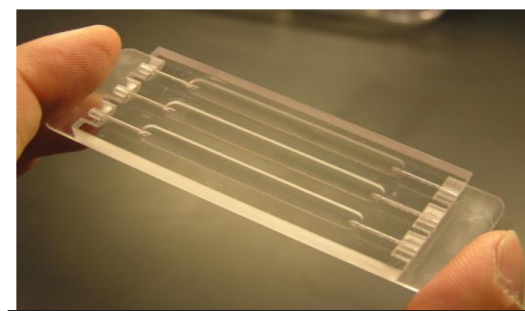


FIG. 1. Dynamics over time (0, 1, 2, 4, and 7 days) of bacterial populations in biofilms treated with different concentrations of AZM (0, 0.5, 1, 4, 16, 64, or 256  $\mu\text{g/ml}$ ) for strains PAO1, PAOMS, PAOMA, and PAOMSA. The total CFU counts are the median values for six different experiments.

# MODELO DE *BIOFILM* EN CELDA DE FLUJO

- Sistema abierto (**dinámico**)
- Adherencia a superficie de vidrio de un cubre-objetos
- Los antibióticos se añaden al medio de cultivo
- CLSM. Bacterias marcadas con FP. **Parámetros estructurales**
- **Visualización y seguimiento *in situ* en tiempo real de modo no destructivo**
- **Grosor > 50  $\mu\text{m}$**
- **Determinación de células viables y mutantes resistentes** (despegado y recolección de los *biofilms*)
- **Laborioso, riesgo de contaminación**



Christensen *et al.* Methods Enzymol 1999  
Heydorn *et al.* Microbiology 2000  
Lee *et al.* J Clin Microbiol 2005



# MODELO DE *BIOFILM* EN CELDA DE FLUJO

## Scheme of the system



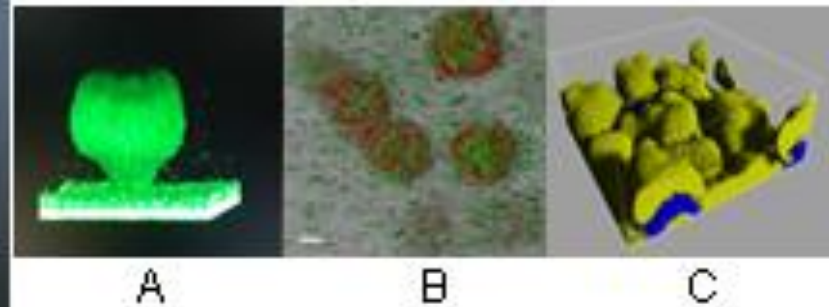
## Parameters of antimicrobial susceptibility study

Structural analysis by Comstat software

- Biomass
- Thickness
- Roughness coefficient
- Substratum coverage
- Surface to volume ratio

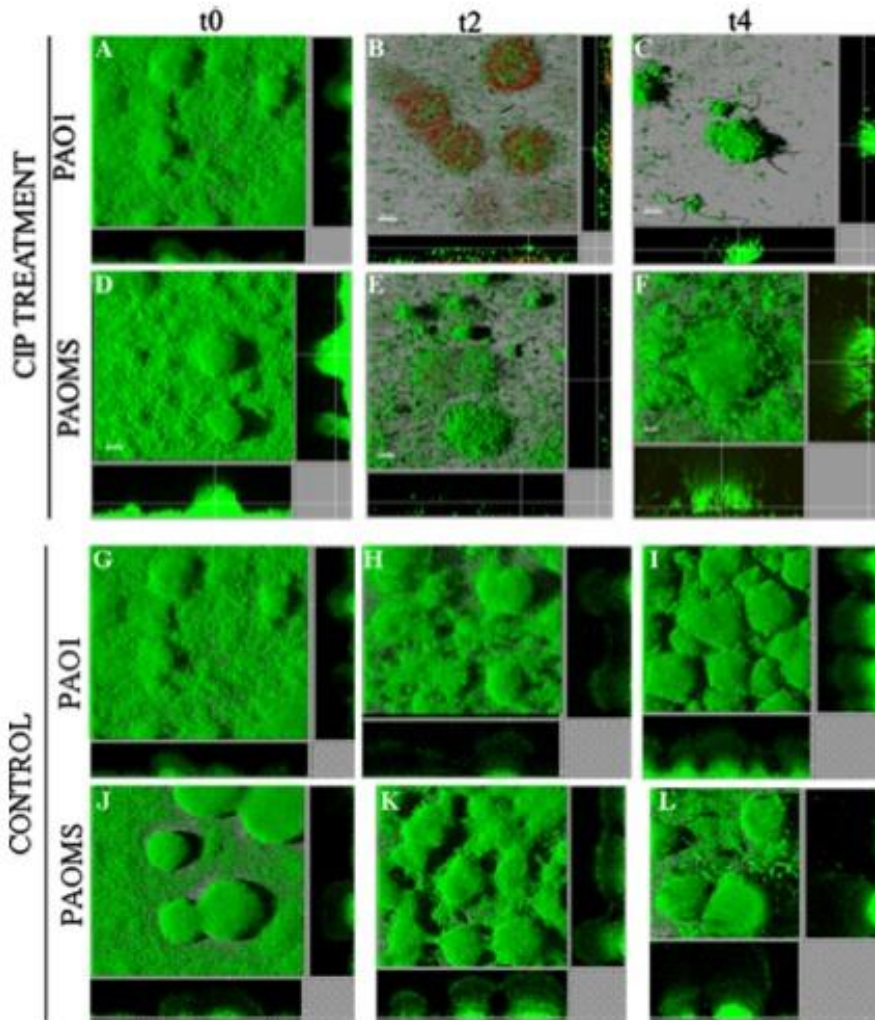
Viable count and determination of antibiotic resistant mutants

3 D reconstructed images



(1) Bote de medio, se añaden los antibióticos y circulan a través de la celda de flujo el tiempo requerido; (2) Bomba peristáltica que proporciona flujo laminar; (3) Jeringas que capturan burbujas destructivas para el biofilm; (4) Celdas de flujo, (5) Bote de residuos.

# ACTIVIDAD BACTERICIDA Y DINÁMICA DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN *BIOFILM* EN UN MODELO PK/PD EN CELDA DE FLUJO



ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Nov. 2011, p. 5230-5237  
0066-4804/11/\$12.00 doi:10.1128/AAC.00617-11  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 55, No. 11

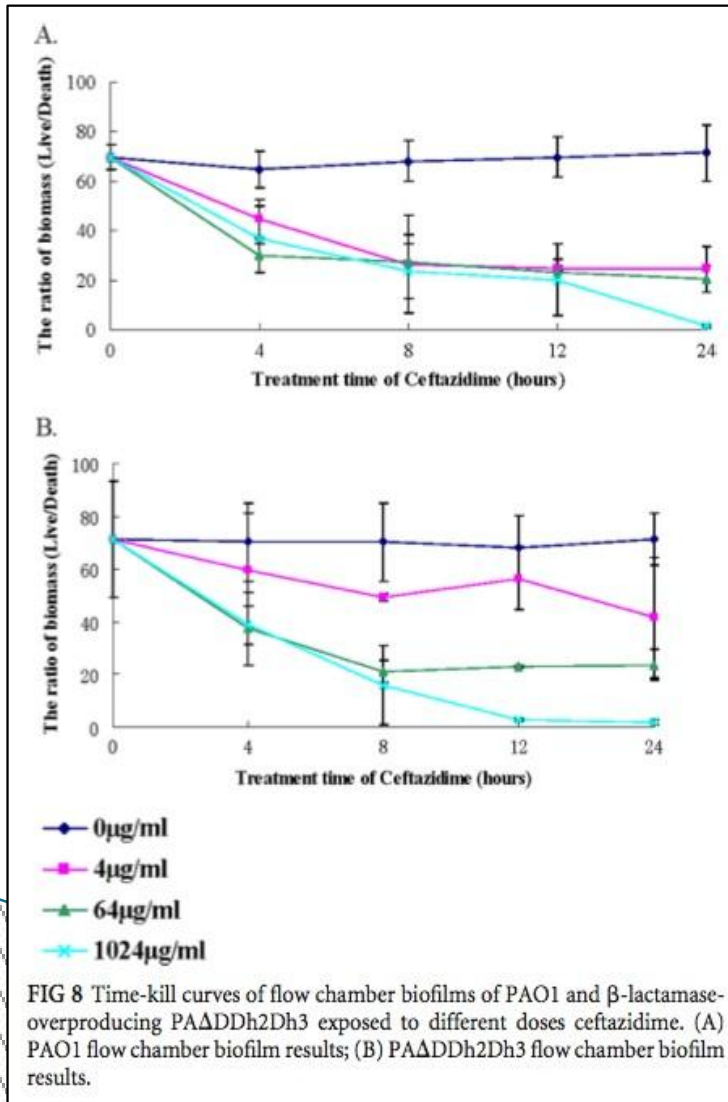
## Dynamics of Mutator and Antibiotic-Resistant Populations in a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Treatment<sup>v</sup>

María D. Macià,<sup>1\*</sup> José L. Pérez,<sup>1</sup> Soeren Molin,<sup>2</sup> and Antonio Oliver<sup>1</sup>

•Ciprofloxacino, uno de los antibióticos más activos en *biofilm*, condujo a la **selección y amplificación de mutantes resistentes**

•Los parámetros PK/PD optimizados no consiguieron la supresión del desarrollo de resistencia en los *biofilms*

# EFFECTO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LOS PARÁMETROS PK/PD (CELDA DE FLUJO)



## High β-Lactamase Levels Change the Pharmacodynamics of β-Lactam Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms

Wang Hengzhuang,<sup>a</sup> Dana Ciofu,<sup>b</sup> Liang Yang,<sup>c,e</sup> Hong Wu,<sup>a,b,e</sup> Zhijun Song,<sup>a</sup> Antonio Oliver,<sup>d</sup> Niels Heiby<sup>a,h,f</sup>

- En *biofilms* hiperproductores de β-lactamasa el patrón bactericida de **ceftazidima** pasa de ser tiempo-dependiente a **concentración dependiente**

# EFECTO DE LA ESTRUCTURA DEL *BIOFILM* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS (CELDA DE FLUJO)

Molecular Microbiology (2008) 68(1), 223–240 ■

doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x  
First published online 28 February 2008

## Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes

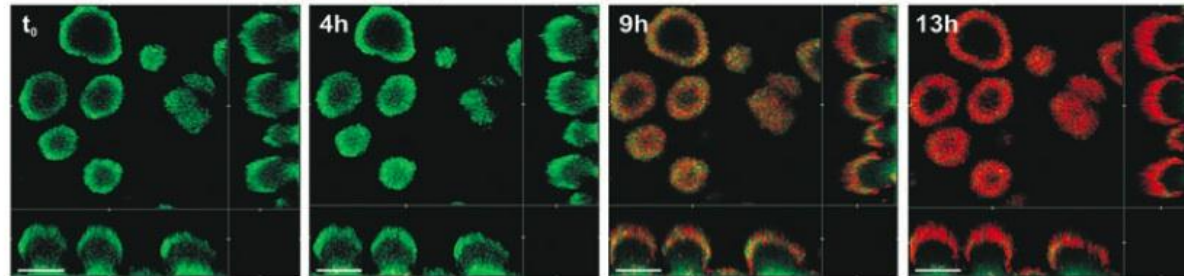
Sünje Johanna Pamp,<sup>1</sup> Morten Gjermansen,<sup>1</sup>  
Helle Krogh Johansen<sup>2,3</sup> and Tim Tolker-Nielsen<sup>4\*</sup>  
<sup>1</sup>BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark,  
Lyngby, Denmark.  
<sup>2</sup>Copenhagen CF Center, Department of Clinical  
Microbiology, Rigshospitalet, Denmark.  
<sup>3</sup>Institute of Medical Microbiology and Immunology,  
Panum Institute, University of Copenhagen,  
Copenhagen, Denmark.  
<sup>4</sup>Risø-DTU, Technical University of Denmark, Lyngby,  
Denmark.

kill the subpopulation of metabolically active biofilm cells, whereas the subpopulation exhibiting low metabolic activity survived the treatment. Consequently, targeting the two physiologically distinct subpopulations by combined antimicrobial treatment with either ciprofloxacin and colistin or tetracycline and colistin almost completely eradicated all biofilm cells.

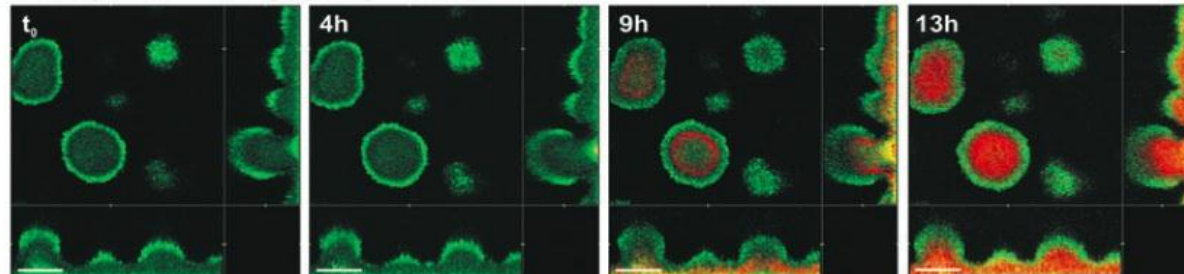
### Introduction

In nature, bacteria are constantly exposed to a variety of small bioactive natural products, also referred to as sec-

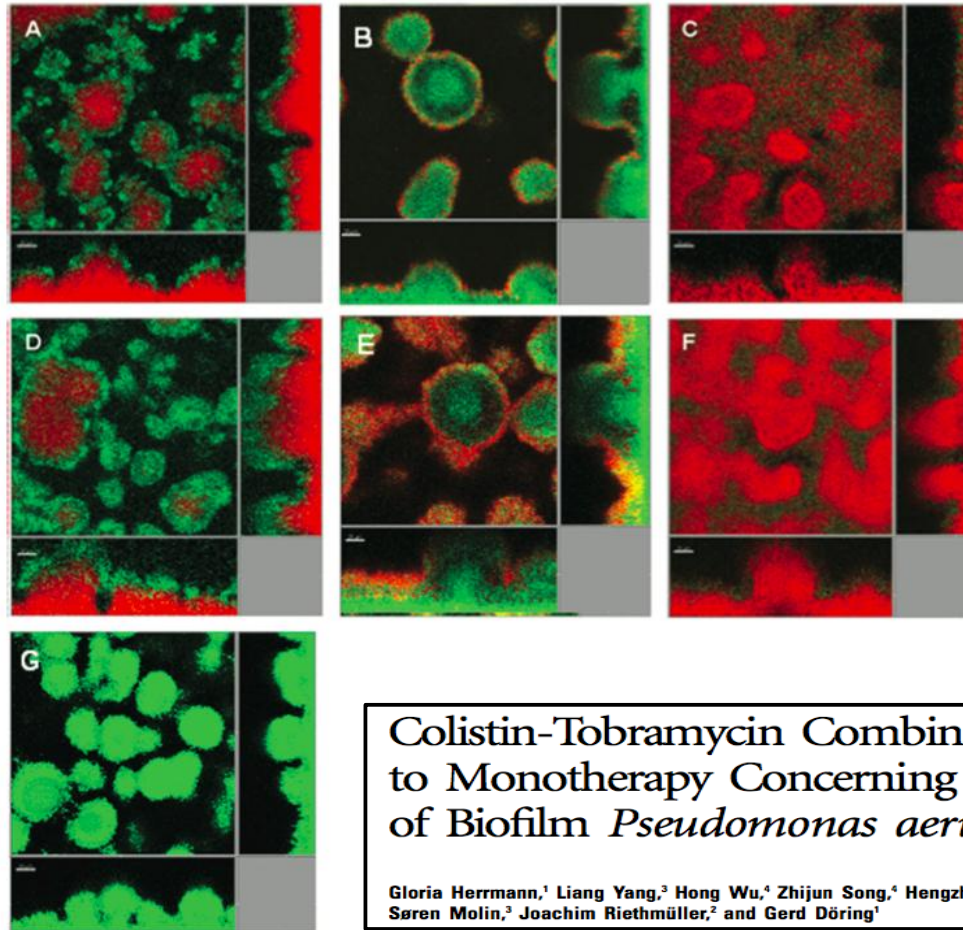
A *P. aeruginosa* *rmBP1-gfp*[AGA] + ciprofloxacin



B *P. aeruginosa* *rmBP1-gfp*[AGA] + colistin



# EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS SOBRE LOS *BIOFILMS* (CELDA DE FLUJO)



Colistin-Tobramycin Combinations Are Superior to Monotherapy Concerning the Killing of Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

Gloria Herrmann,<sup>1</sup> Liang Yang,<sup>3</sup> Hong Wu,<sup>4</sup> Zhijun Song,<sup>4</sup> Hengzhuang Wang,<sup>4</sup> Niels Høiby,<sup>4</sup> Martina Ulrich,<sup>1</sup> Søren Molin,<sup>3</sup> Joachim Riethmüller,<sup>2</sup> and Gerd Döring<sup>1</sup>

Herrmann *et al.* J Infect Dis 2010

# PROYECTO TERAPIA SECUENCIAL ALTERNADA (CATINVITRO)

## Mecanismos antagónicos de resistencia:

- El tratamiento con aminoglucósidos conduce a la selección de mutantes que hiperexpresan MexXYOprM
- La hiperexpresión de MexXYOprM está relacionada con la inactivación de MexABOprM
- El tratamiento secuencial con aminoglucósidos (tobramicina) seguido de aztreonam puede conllevar una mejora clínica **aumentando la eficacia terapéutica y disminuyendo la selección de mutantes resistentes**

# CONCLUSIONES

- Complejidad de los mecanismos del *biofilm* en interacción con los antibióticos
- Estandarización de los procedimientos, métodos y puntos de corte (CLSI, EUCAST) previa a la implementación en los laboratorios de microbiología clínica
- Implementar estudios de S basados en modelos fáciles/reproducibles que proporcionen puntos de corte (MBIC, MBEC, BBC o BPC)
- Sistemas más complejos (celda de flujo) → dinámica del *biofilm* con antibióticos existentes/nuevos, elucidar mecanismos de R, determinar PK/PD óptimos
- Más estudios *in vivo* y ensayos clínicos guiados por los resultados de estudios de S en *biofilms*

# GRACIAS POR LA ATENCIÓN

**Servicio de Microbiología e IdISPa**

**Línea de investigación en infecciones bacterianas crónicas (*biofilms*)**

**Estrella Rojo-Moliner (Residente 4º año)**

**Tomeu Moyà (Post-doc)**

**Rosa Rubio (Residente 3º año)**

**Xavier Mulet (FEA Microbiología)**

**María D. Macià (FEA Microbiología)**

**Antonio Oliver (FEA Microbiología)**

