



***Actividad de los  
antimicrobianos en biocapas  
bacterianas***

***Álvaro Pascual. Hospital Universitario  
Virgen Macarena. Universidad de Sevilla***

# Infecciones asociadas a biomateriales. EEUU.

<b>Implante</b>	<b>n° /año</b>	<b>Infecciones</b>	<b>Mortalidad</b>
<b>Catéter intravascular</b>	<b>200.000.000</b>	<b>&lt;0,1-7%</b>	<b>15-20%</b>
<b>Sonda uretral</b>	<b>5.000.000</b>	<b>5-10%</b>	
<b>Shunts LCR</b>	<b>80.000</b>	<b>10-15%</b>	
<b>Marcapasos</b>	<b>60.000</b>	<b>0-3%</b>	<b>2%</b>
<b>Válvulas protésicas</b>	<b>100.000</b>	<b>1-5%</b>	<b>34%</b>
<b>Prótesis articulares</b>	<b>350.000</b>	<b>&lt;1-2%</b>	<b>2,5%</b>
<b>Implantes dentales</b>	<b>436.000</b>	<b>15%</b>	

Wadvogel et al. 2000

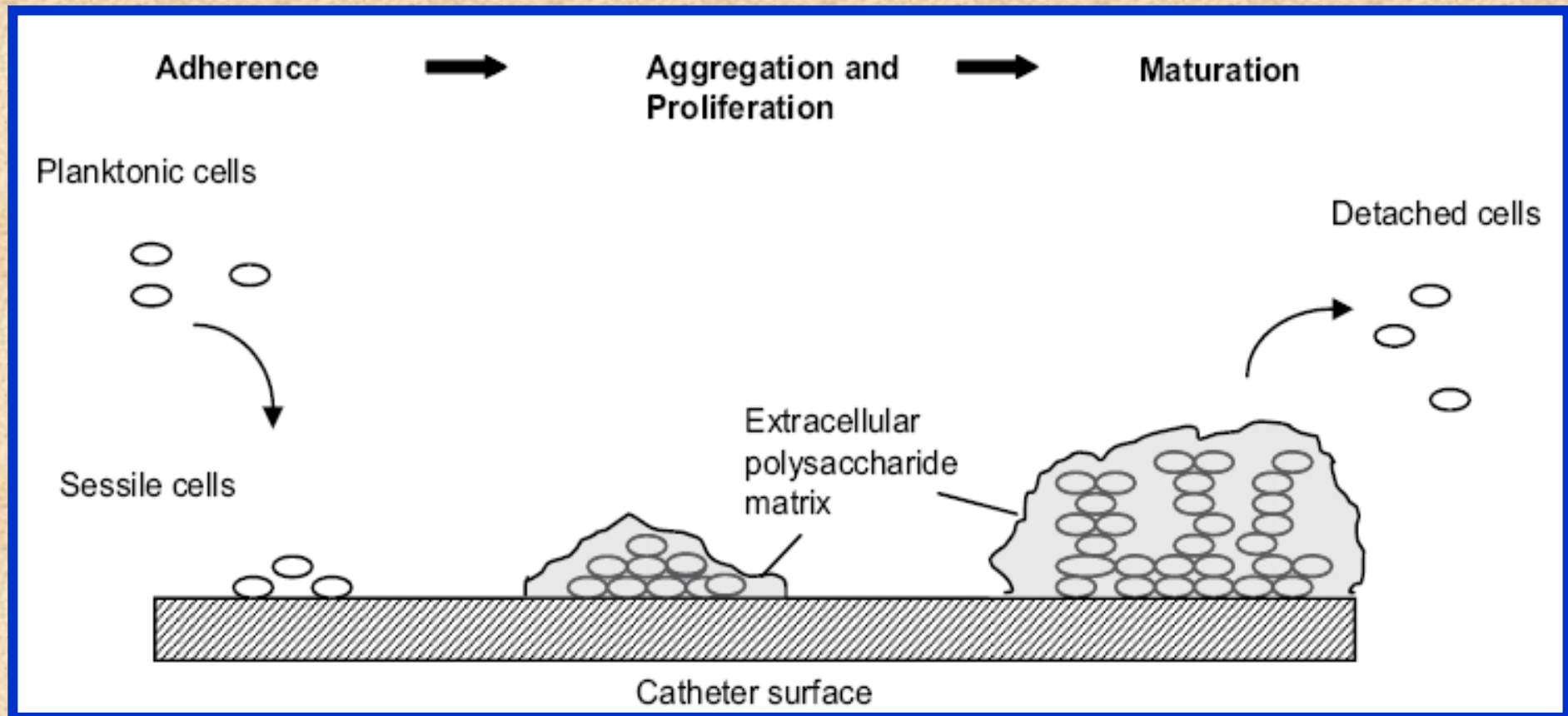
# Etiología de bacteriemias asociadas a CVC



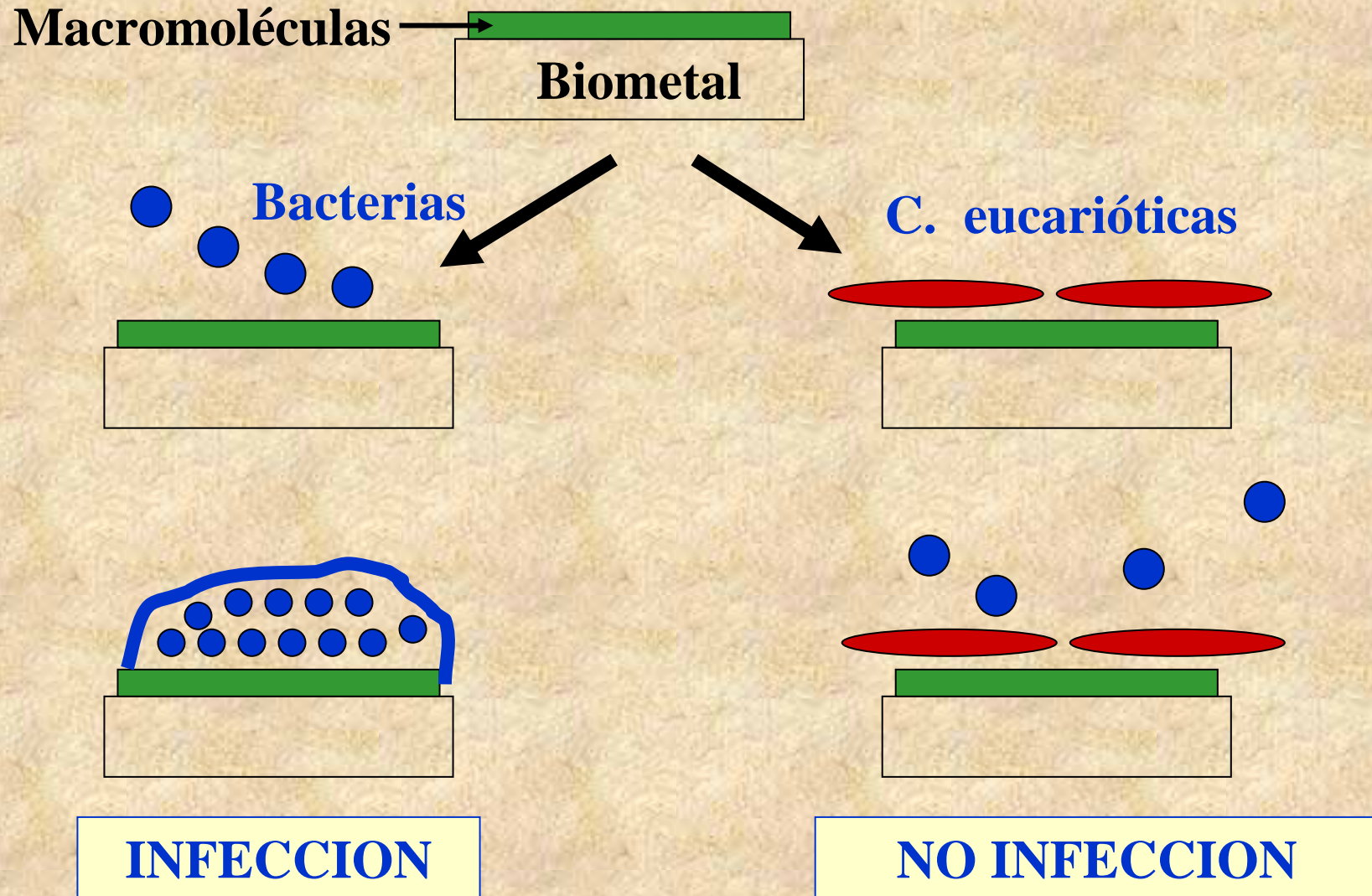
## Microorganismo

<i>S. epidermidis</i>	45.0%
<i>S. aureus</i>	16.5%
Otros ECN	16.2%
Enterobacterias	10.6%
<i>Candida spp</i>	7.2%
BGNMF	3.3%
<i>Enterococcus spp</i>	3.3%
Corinebacterias	2.3%

# Dinámica de biocapa bacteriana



# La carrera por la superficie.



A. Gristina. 1985

# Adherencia de *Staphylococcus spp*

Microorganismo	Adhesina	(Receptor)
<i>S. aureus</i>	Ácido teicoico	(fibrinógeno)
	MSCRAMM	
	FnBPA	(fibrinógeno)
	Cna	(colágeno)
	ClfA	(fibronectina)
	Ebps	(elastina)
<i>S. epidermidis</i>	EAP	
	Bap	
	AtlE	(vitronectina)
	Ácido teicoico	(fibrinógeno)
	MSCRAMM	
	Fbe	(fibrinógeno)
Embp	(fibronectina)	
	SSP-1 y SSP-2	

# ***Slime de Staphylococcus epidermidis***

- 1. Compuesto de N-acetilglucosamina.**
- 2. Constituido por 2 fracciones polisacáridas: Polisacárido de adhesión intracelular.**
- 3. Codificado por operon *ica*.**

# **Funciones del *slime* de *Staphylococcus epidermidis***

- 1. Protección frente a los mecanismos de defensa**
- 2. Actividades biológicas**
- 3. Protección frente a los antimicrobianos**
  - Barrera mecánica**
  - Inactivación**
  - Latencia bacteriana**
  - Otros**

# *Quorum sensing y Staphylococcus*

- **Regulación de expresión de genes dependiente de la densidad de población bacteriana.**
- **Determinan la expresión de toxinas, de factores de virulencia y formación de biocapas (en *P. aeruginosa*).**
- **Existen 2 sistemas (*agr* y *luxS*).**

# Quorum sensing y *S. aureus*

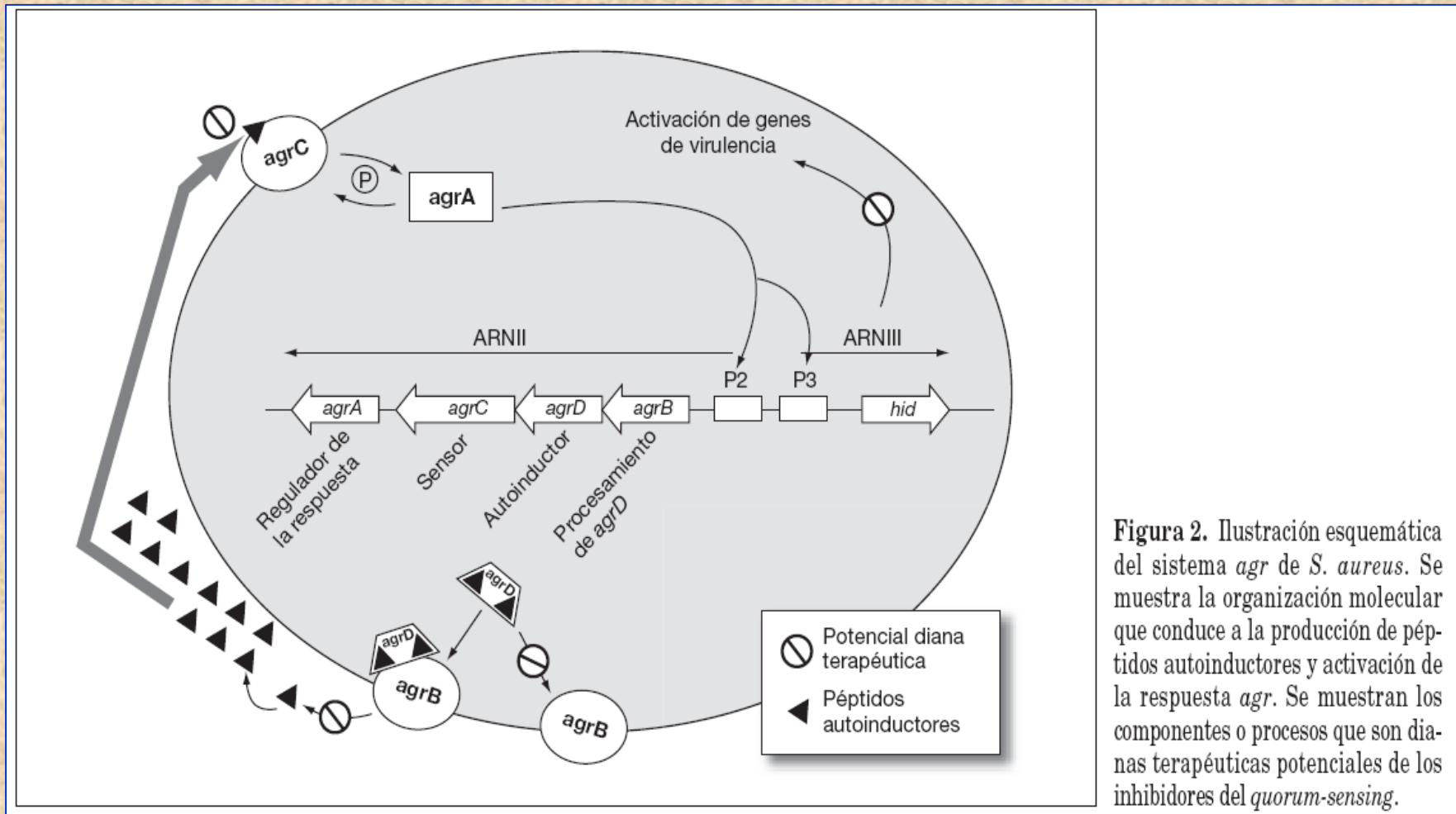


Figura 2. Ilustración esquemática del sistema *agr* de *S. aureus*. Se muestra la organización molecular que conduce a la producción de péptidos autoinductores y activación de la respuesta *agr*. Se muestran los componentes o procesos que son dianas terapéuticas potenciales de los inhibidores del quorum-sensing.

# *Quorum sensing y Staphylococcus spp*

- *agr* y *luxS* reducen la formación de biocapas y la virulencia en infecciones asociadas a biocapas.
  - *agr* induce el desprendimiento (detachment) de las biocapas.
  - *luxS* reduce la adhesión bacteria-bacteria mediante la inhibición en la producción de PIA (slime).
- *Quorum sensing* es importante en fases de crecimiento rápido pero se inhibe en fases estacionarias como la que ocurre en biocapas.

## REVIEW

***Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection**Kok-Fai Kong<sup>a,b</sup>, Cuong Vuong<sup>a</sup>, Michael Otto<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Laboratory of Human Bacterial Pathogenesis, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, The National Institutes of Health, 903 S 4th Street, Hamilton, MT 59840, USA<sup>b</sup>Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, FL, USA**Table 2.** Results from animal models that support or call into question a significant role of *agr* during *Staphylococcus* infections

Support	Call into question
Murine septic arthritis (Abdelnour et al., 1993)	Murine abscess (Kielian et al., 2001; Schwan et al., 2003)
Murine osteomyelitis (Blevins et al., 2003)	Murine wound (Schwan et al., 2003)
Murine acute pulmonary infection (Heyer et al., 2002)	Rabbit biofilm-associated infections (Vuong et al., 2004b)
Murine staphylococcal systemic infection (Schwan et al., 2003)	Rabbit endocarditis (Cheung et al., 1994)
Rabbit osteomyelitis (Gillaspy et al., 1995)	Rabbit osteomyelitis (Gillaspy et al., 1995)
Rabbit endophthalmitis model (Booth et al., 1997)	Rabbit toxic shock syndrome (Yarwood et al., 2002)
	Sputa of cystic fibrosis patients (Goerke et al., 2000)

# Antimicrobianos y biocapas

## Cuestiones previas



- Las biocapas bacterianas no sólo se relacionan con material protésico.
- La biocapa es un fenómeno muy complejo sujeto a factores ambientales y genéticos.
- Es muy difícil reproducir una biocapa *in vitro*.
- Las discrepancias de resultados se deben a diferencias metodológicas:
  - Edad de la biocapa
  - Metodología estática o dinámica.

## Actividad de 8 antimicrobianos frente a biocapas de *S. epidermidis* en cateter de Teflon.

**CMBbiocapa/CMBplanctónica**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Slime -</b>	<b>Slime +</b>
<b>Amicacina</b>	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;128</b>
<b>Clindamicina</b>	<b>&gt;1.024</b>	<b>&gt;128</b>
<b>Cloxacilina</b>	<b>&gt;512</b>	<b>&gt;256</b>
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>&gt;1.024</b>	<b>&gt;256</b>
<b>Vancomicina</b>	<b>&gt;256</b>	<b>32</b>
<b>Teicoplanina</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;16</b>
<b>Rifampicina</b>	<b>&gt;32.768</b>	<b>&gt;8.192</b>

Ramírez et al. J Hosp Infect. 1993

## Actividad de glicopéptidos (4 x CMB) frente a biocapas de *S. epidermidis*

Bacterias x 10<sup>3</sup>/segmento de catéter

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Teflon</b>	<b>Poliuretano</b>
<b>Vancomicina</b>	<b>1.860</b>	<b>3.270</b>
<b>Teicoplanina</b>	<b>363</b>	<b>316</b>
<b>V + Amicacina</b>	<b>0,2</b>	<b>242</b>
<b>V + Rifampicina</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>
<b>T + Amicacina</b>	<b>3,6</b>	<b>0</b>
<b>T + Rifampicina</b>	<b>3,1</b>	<b>0</b>

# Mecanismos de resistencia de biocapas bacterianas



- 1. Impermeabilidad de la biocapa.**
- 2. Secuestro por el glicocálix.**
- 3. Expresión de nuevos mecanismos de resistencia o hiperexpresión de clásicos.**
- 4. Adaptación de bacterias al stress (bacterias persistentes).**
- 5. Resistencia inducida por biomateriales.**

**TABLA 2. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en biocapas bacterianas**

Mecanismo de resistencia	Especies bacterianas estudiadas	Principales agentes antimicrobianos afectados	Referencia
Impermeabilidad de las biocapas a los agentes antimicrobianos	<i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósidos	Coquet et al (1998) <sup>6</sup> ; Bdi-Ali et al (2006) <sup>7</sup> ; Hatch et al (1998) <sup>8</sup>
		Betalactámicos	Coquet et al (1998) <sup>6</sup> ; Bdi-Ali et al (2006) <sup>7</sup>
	<i>S. epidermidis</i>	Vancomicina	Rodríguez-Martínez et al (2007) <sup>9</sup> ; Souli y Giamarellou (1998) <sup>49</sup>
Tasa alterada de crecimiento	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i>	Betalactámicos	Tanaka et al (1999) <sup>15</sup>
		Ciprofloxacino	Costerton et al (1999) <sup>1</sup>
El microambiente de las biocapas afecta a la actividad antibacteriana	Característica general de las biocapas	Aminoglucósidos	Jorgensen JH et al (1999) <sup>17</sup> , Field et al (2005) <sup>18</sup>
Mecanismos de resistencia expresados en bacterias planctónicas	<i>P. aeruginosa</i>	Macrólidos Tetraciclinas Azitromicina Betalactámicos Tobramicina	Jorgensen et al (1999) <sup>17</sup> Jorgensen et al (1999) <sup>17</sup> Gillis et al (2005) <sup>20</sup> Bagge et al (2000) <sup>19</sup> Mah et al (2003) <sup>21</sup>
Elementos genéticos de transferencia horizontal	<i>Enterobacteriaceae</i>	Betalactámicos Aminoglucósidos	Reisner et al (2006) <sup>25</sup>
	<i>L. lactis</i>	Betalactámicos	Luo et al (2005) <sup>26</sup>
<i>Quorum-sensing</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósidos <i>Quorum-sensing inhibitors</i>	Singh et al (2000) <sup>4</sup> Bjarnsholt et al (2005) <sup>50</sup>

# Permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *S. epidermidis*.

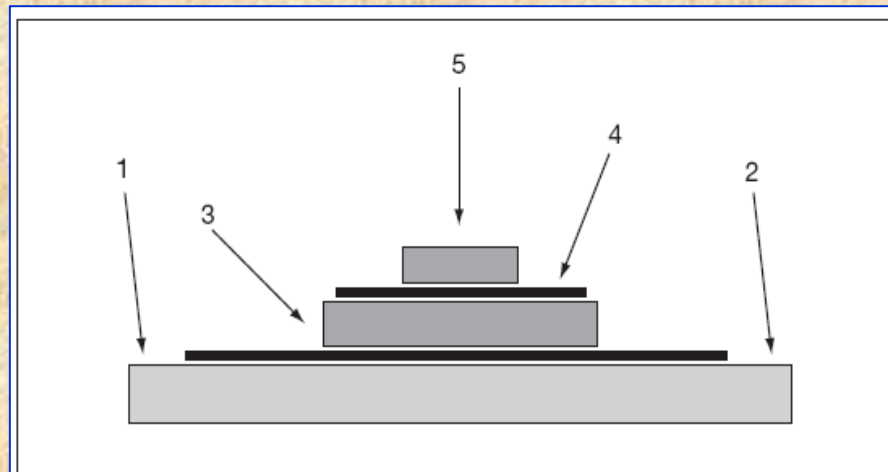


Figura 1. Descripción esquemática del método empleado para determinar la permeabilidad de las biocapas a los antimicrobianos. Las biocapas (3) se desarrollaron sobre membranas de policarbonato de 25 mm (2) depositadas en medio MH agar (1). Sobre la biocapa se colocó otra membrana de policarbonato de 13 mm (4). Finalmente, sobre esta estructura en sándwich se depositó el disco de antimicrobiano (5).

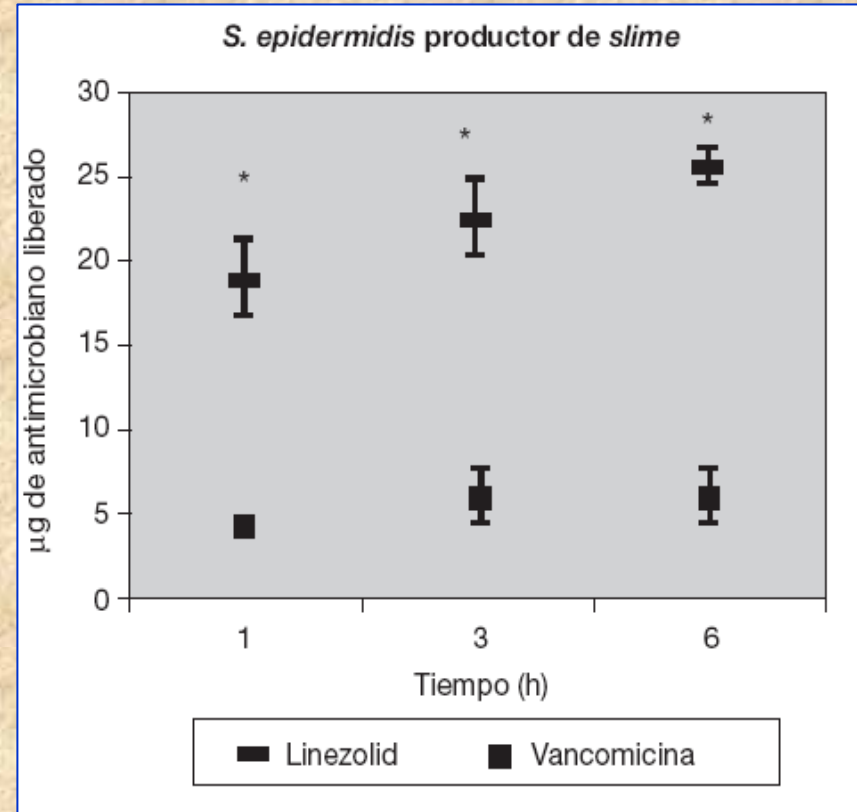


Figura 2. Penetración de los antimicrobianos a través de biocapas bacterianas sobre filtros de policarbonato. Los datos (media  $\pm$  desviación estándar) se expresan como  $\mu\text{g}$  de antimicrobiano liberados de discos de 30  $\mu\text{g}$  de linezolid y vancomicina ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  comparado con vancomicina.

# Actividad de linezolid y vancomicina frente a Biocapas de *S. epidermidis*.

TABLA 1. Supervivencia bacteriana de *S. epidermidis* formando biocapas de 24 h sobre catéteres de silicona tras la exposición a diferentes concentraciones de linezolid y vancomicina. Control: biocapas no tratadas con antimicrobiano. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 4)

Concentración de antibiótico ( $\mu\text{g/ml}$ )	UFC $\times 10^3$ /segmento de catéter			
	<i>S. epidermidis</i> productor de <i>slime</i>		<i>S. epidermidis</i> no productor de <i>slime</i>	
	Linezolid	Vancomicina	Linezolid	Vancomicina
0 (control)	440 $\pm$ 96		390 $\pm$ 88	
1	1,1 <sup>*,***,****</sup> $\pm$ 0,1	115* $\pm$ 20	5,8 <sup>*,**</sup> $\pm$ 0,8	186* $\pm$ 30
8	0,6 <sup>*,**</sup> $\pm$ 0,04	1,2* $\pm$ 0,14	1,1 <sup>*,**</sup> $\pm$ 0,6	3,9* $\pm$ 0,8
16	0,012 <sup>*,***,****</sup> $\pm$ 0,003	0,7 <sup>*,****</sup> $\pm$ 0,05	0,18 <sup>*,**</sup> $\pm$ 0,05	2,0* $\pm$ 0,12

\*p < 0,05 comparado con el valor obtenido para la misma cepa sin antimicrobiano (control).

\*\*p < 0,05 comparado con el valor obtenido para la misma cepa frente a vancomicina.

\*\*\*p < 0,05 comparado con el valor obtenido para la cepa no formadora de biocapa y el mismo antimicrobiano.

UFC: unidades formadoras de colonias.

# **Principales limitaciones de los metodos *in vitro*.**

- **Metodología diferente**
- **Modelos estáticos**
- **Biocapas jóvenes (no maduras)**
- **Periodos de incubación corto**

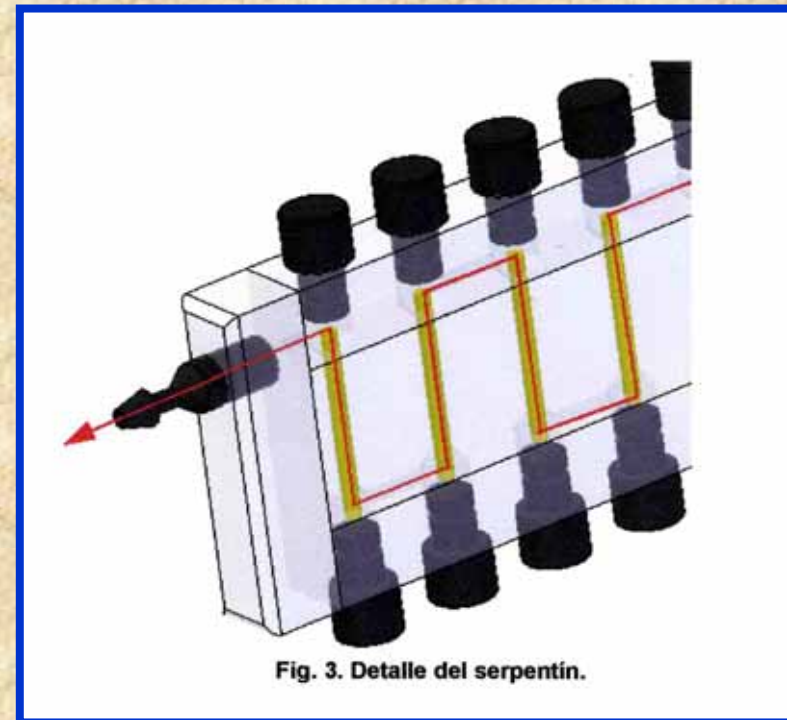
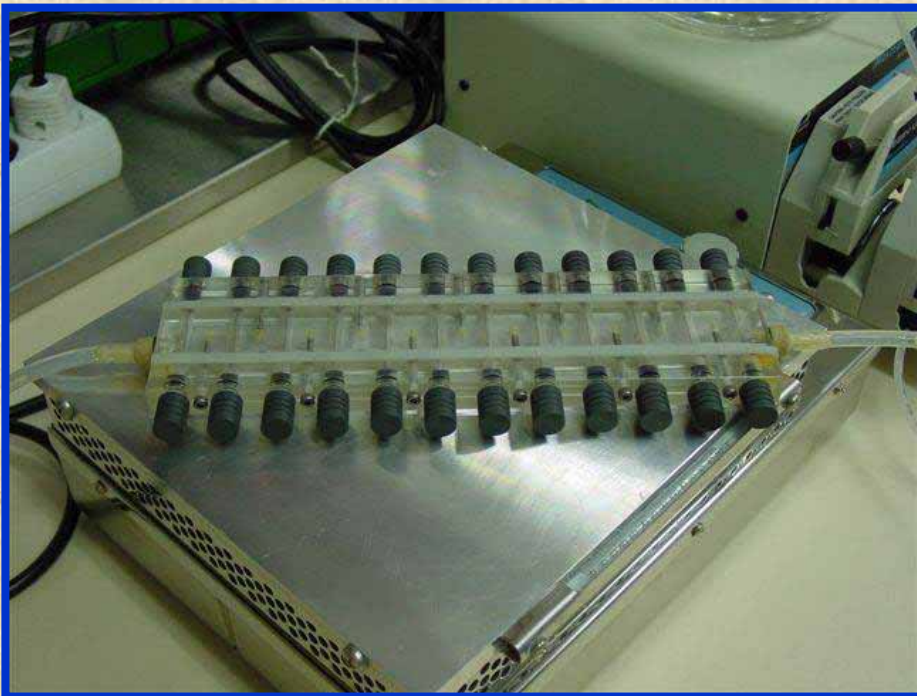


***A dynamic in vitro model for evaluating antimicrobial activity against bacterial biofilms using a new device and clinically-used catheters***

**I. García<sup>1</sup>, M.C. Conejo<sup>1</sup>, A. Ojeda<sup>2</sup>, J. Rodríguez-Baño<sup>2</sup>,  
A. Pascual<sup>1</sup>.**

**Dpt. of Microbiology and Infectious Diseases. Hospital. U. V. Macarena, Seville, Spain<sup>1</sup>. University of Seville<sup>2</sup>,. Fluid Mechanics. School of Engineering<sup>3</sup>. Sevilla. Spain.**

# Método Dispositivo Sevilla



ICAAC 2008. Washington DC.

# Material y Métodos

- **Cepas y CMIs:**
  - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (*ica* +: productor de slime)
  - CMI (microdilution, CLSI):
    - Daptomicina 0.5 mg/L
    - Vancomicina 2.0 mg/L
- **Substratos:**
  - Catéteres de poliuretano (diámetro: 7F).

# Material y Métodos

- **Formación de biocapas:**

**Modelo dinámico con flujo continuo (40 ml/h de MHB), 37°C, inóculo inicial de  $10^6$  ufc/ml.**

**–Poliuretano: Biocapas juvenes: 24 h**

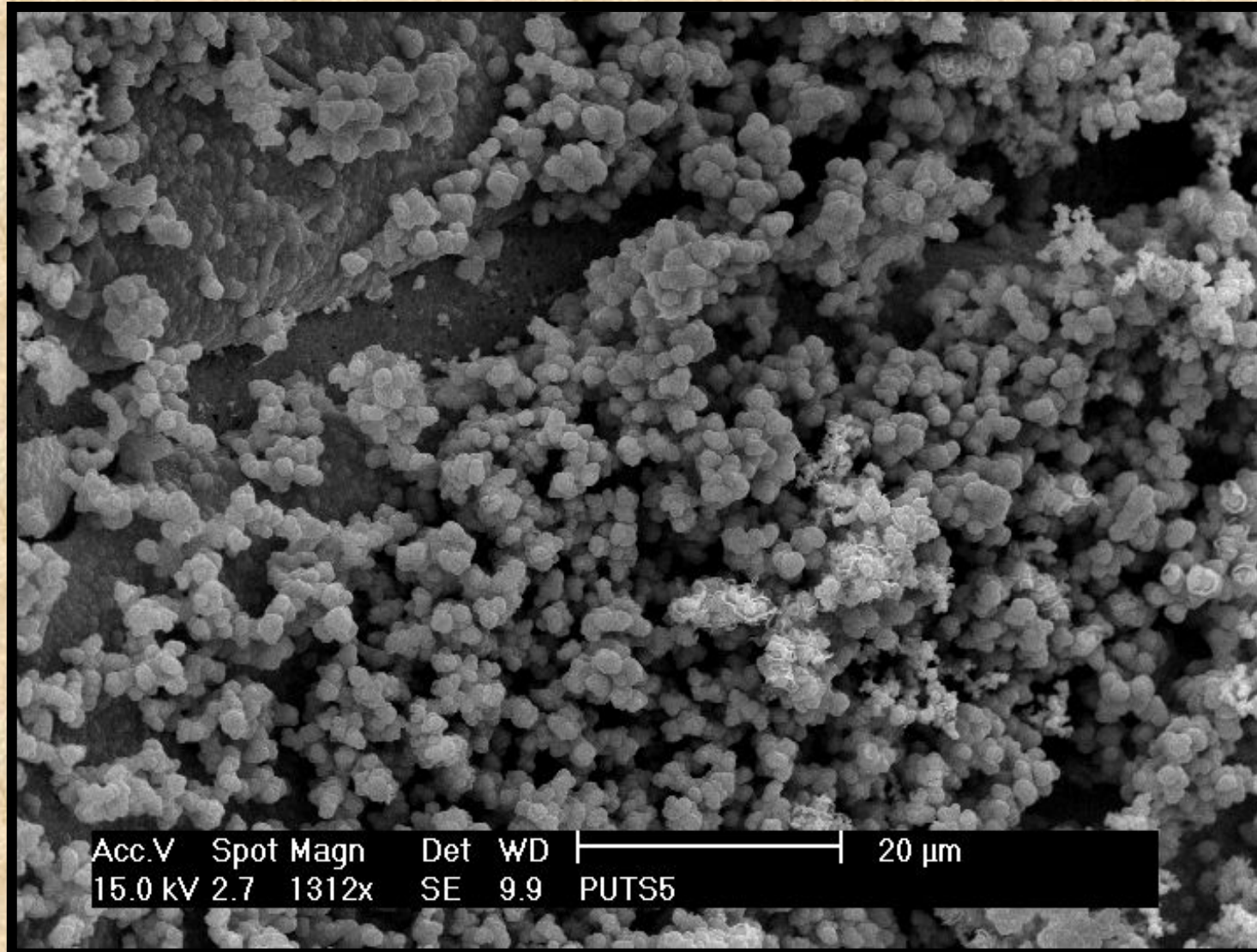
- **Actividad antimicrobiana:**

**Daptomicina o Vancomicina a 20mg/l.**

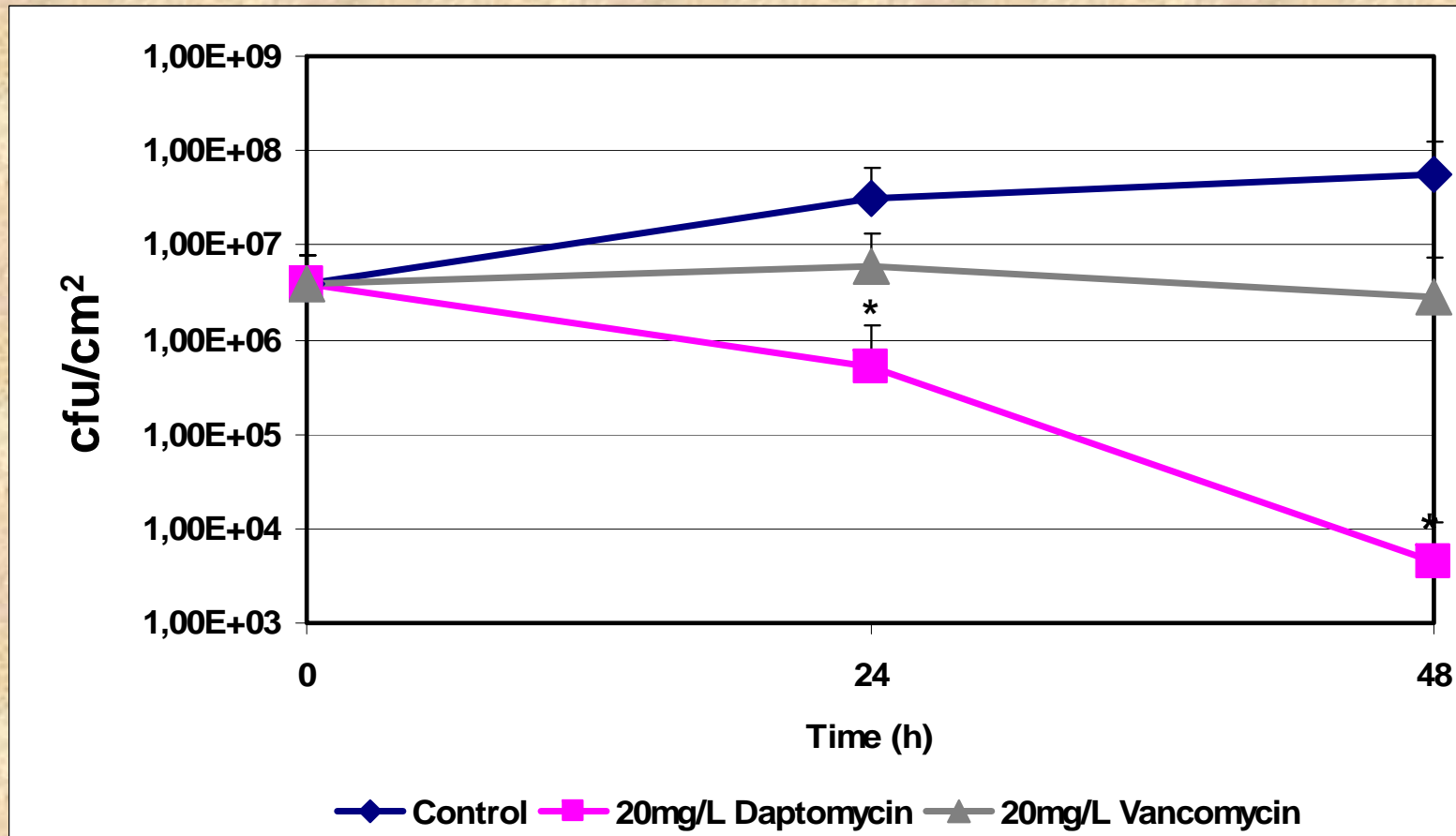
- **Tiempos de incubación: 24 y 48 h.**

**–Los segmentos se lavan, sonicán, se diluye el sobrenadante y se cultiva para recuento (n=3).**

# Resultados Poliuretano



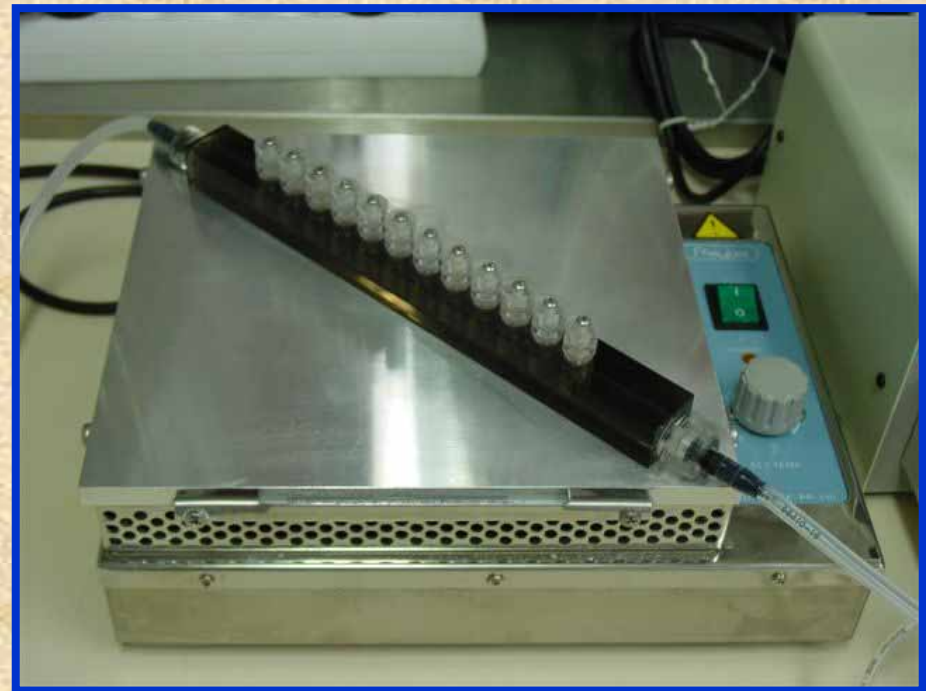
# *S. epidermidis* slime + Poliuretano. Biocapa de 24 h



\*  $p < 0.05$  comparada a vancomicina

ICAAC 2008. Washington DC.

# Método Dispositivo de Robbins



ICAAC 2008. Washington DC.

# Material y Métodos

- **Cepas:**
  - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (*ica* +: productor de slime)
  - SARM: aislado clínico de infección protésica
- **Substratos:**
  - Discos de acero inoxidable

# Material y Métodos

- **Formación de biocapas:**

**Modelo dinámico con flujo continuo (40 ml/h de MHB), 37°C, inóculo inicial de 10<sup>6</sup> ufc/ml..**

**–Acero inox: Biocapas maduras: 96 h**

- **Actividad antimicrobiana:**

**–Daptomicina y Vancomicina: 20mg/l.**

**–Linezolid: 10 y 30mg/l.**

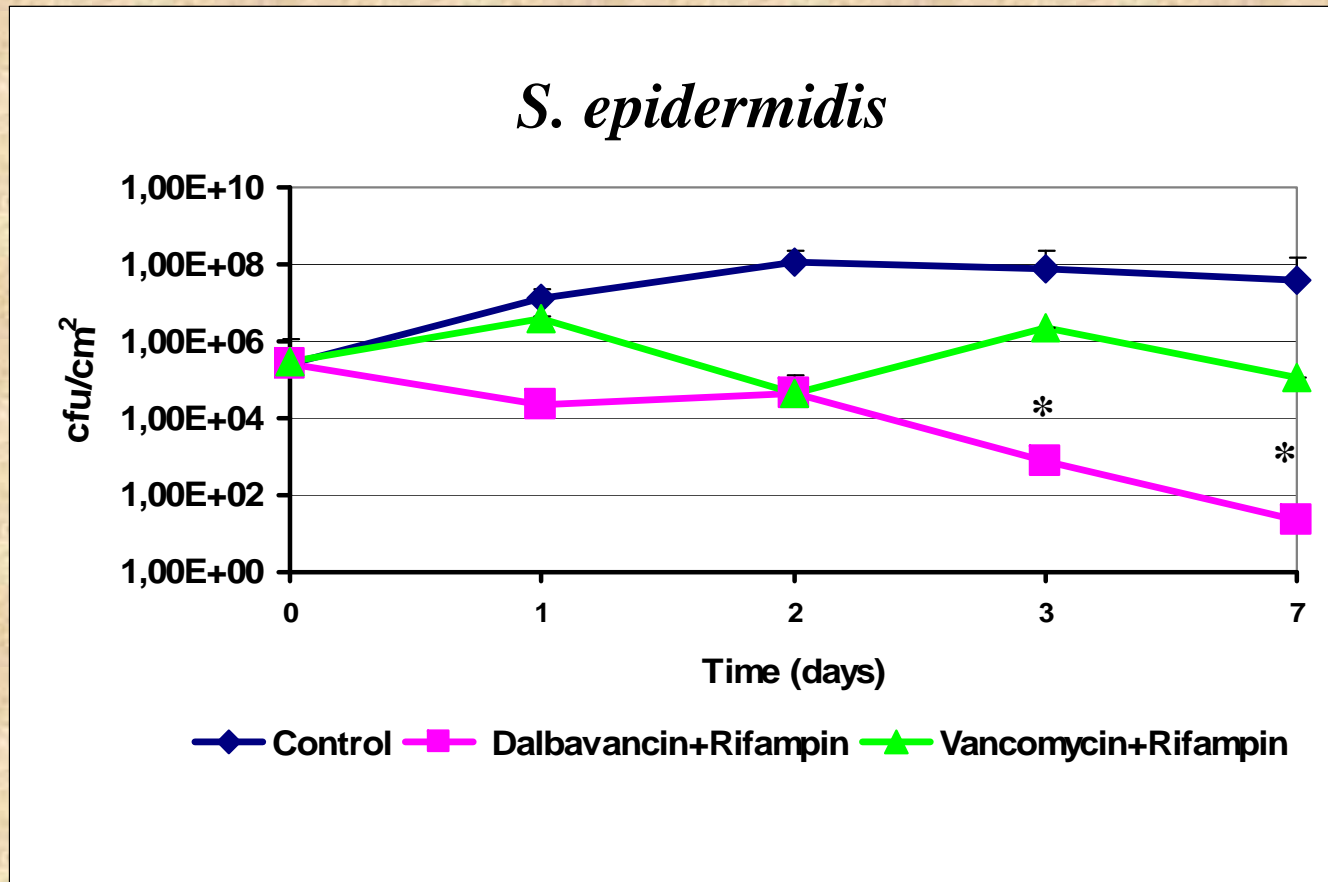
**–Dalbavancina: 5mg/l.**

**–Rifampicina: 3mg/l**

- **Tiempos de incubación: 24, 48 y 72h.**

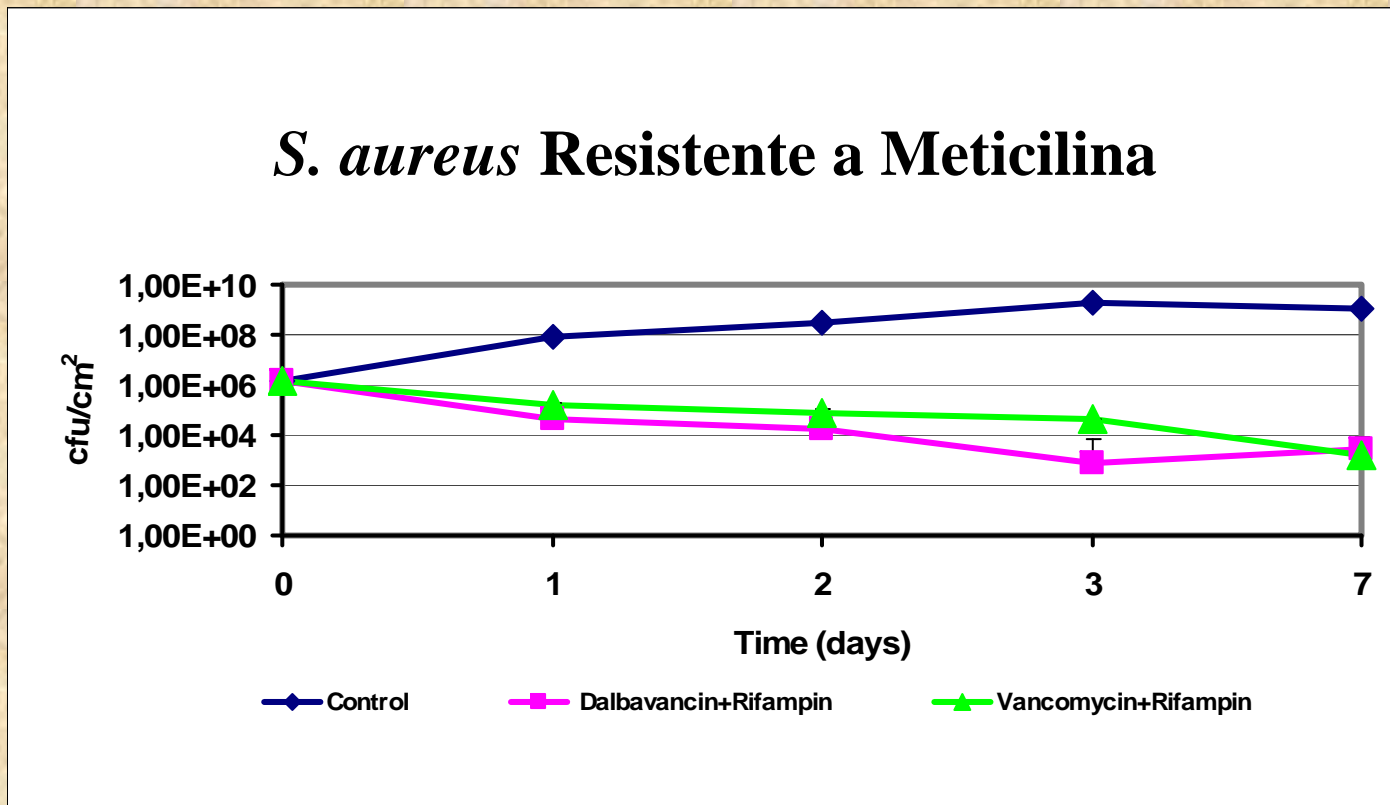
**–Los segmentos se lavan, sonicán, se diluye el sobrenadante y se cultiva para recuento (n=3).**

# Dalvabancina/Vancomicina + Rifampicina

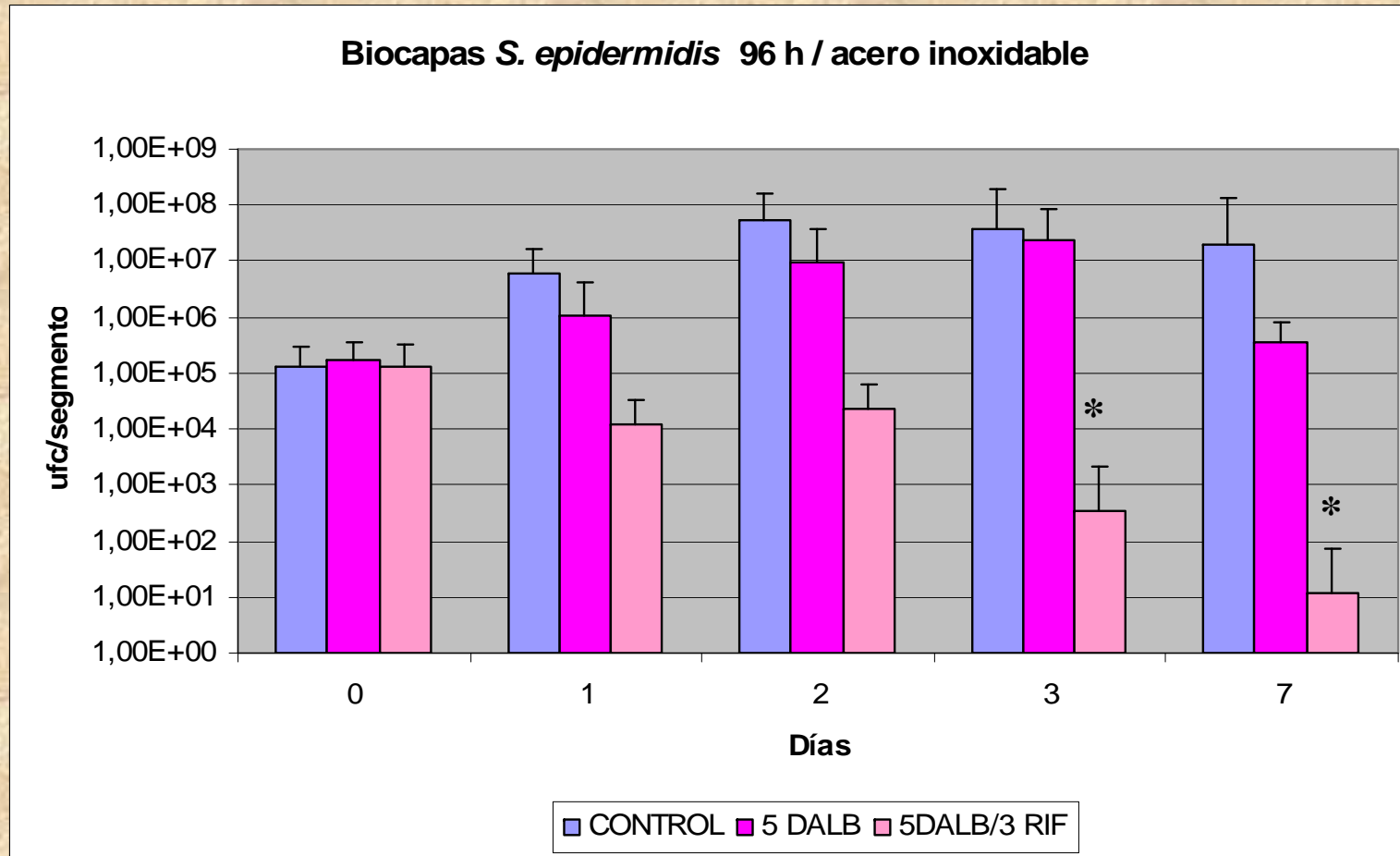


\*p< 0.05 compared to Vancomycin + Rifampin.

# Dalvabancina/Vancomicina + Rifampicina



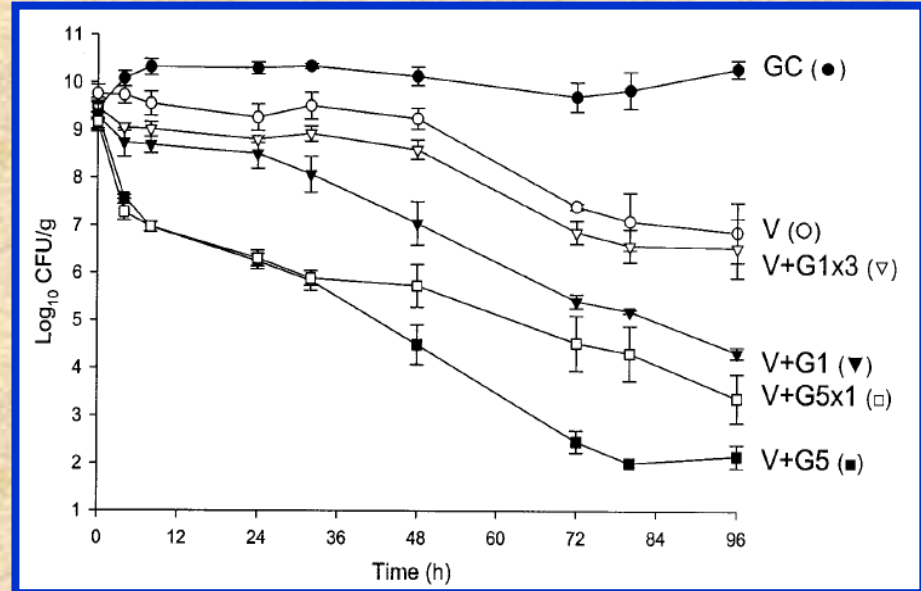
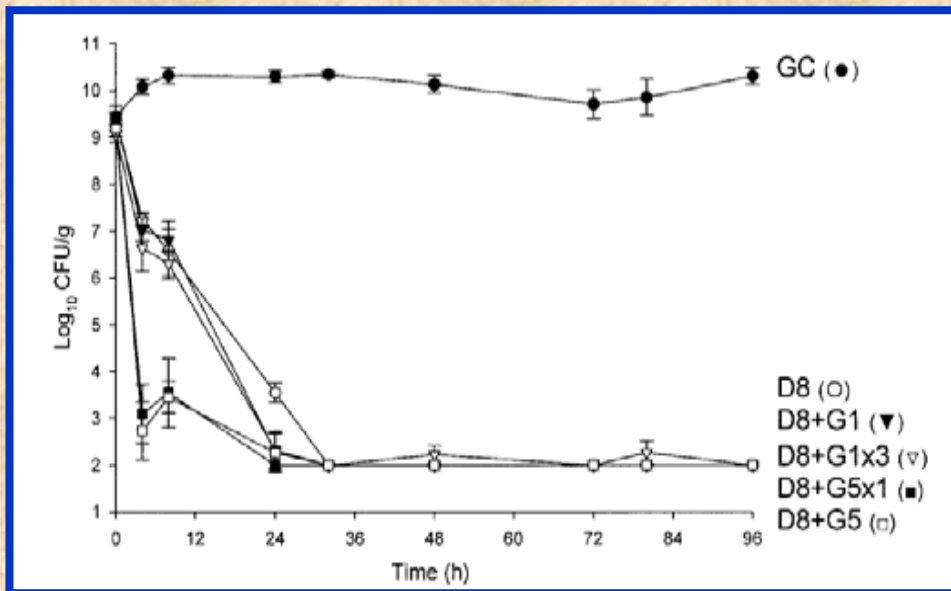
# Actividad de Dalbavancina Acero Inoxidable. Biocapas 96 h



\*  $p < 0.05$  comparada a control

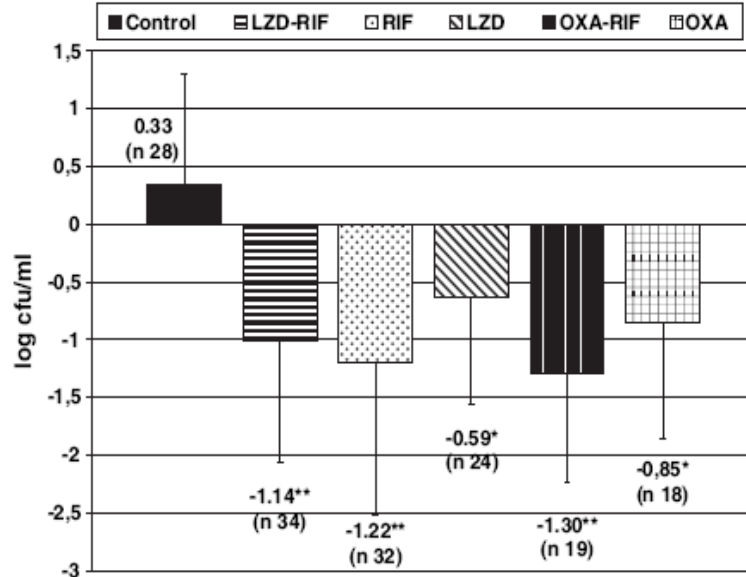
# Short-Course Gentamicin in Combination with Daptomycin or Vancomycin against *Staphylococcus aureus* in an In Vitro Pharmacodynamic Model with Simulated Endocardial Vegetations

Brian T. Tsuji<sup>1,2</sup> and Michael J. Rybak<sup>1,2,3\*</sup>

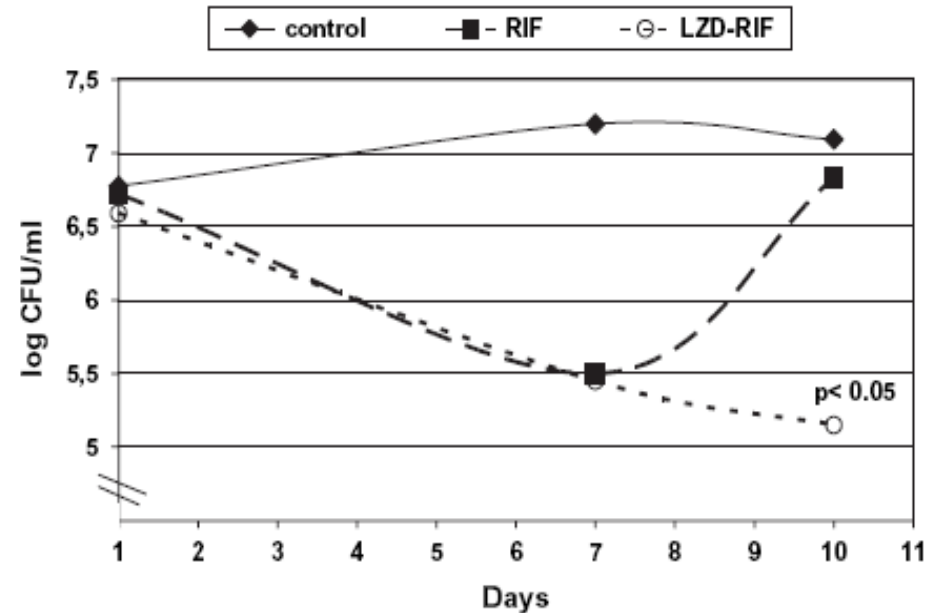


# Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection

Oscar Murillo <sup>a,\*</sup>, Alejandro Domenech <sup>a</sup>, Gorane Euba <sup>a</sup>, Ricard Verdaguer <sup>c</sup>, Fe Tubau <sup>c</sup>, Javier Cabo <sup>b</sup>, Carmen Cabellos <sup>a</sup>, Francesc Gudiol <sup>a</sup>, Javier Ariza <sup>a</sup>



**Figure 2** Comparison of decreases in log cfu/ml (mean) from TCF between groups at the end of 7-day therapy. Errors bars indicate standard deviations. The number of tissue cages is shown in square brackets. Abbreviations: OXA, cloxacillin; LZD, linezolid; RIF, rifampin. \* $P < 0.05$  versus control; \*\* $P < 0.05$  versus control and LZD.



**Figure 3** Evolution of bacterial counts (log cfu/ml) from TCF over time. Abbreviations: OXA, cloxacillin; LZD, linezolid; RIF, rifampin.  $P < 0.05$  indicates significantly increases over time (ANCOVA).

# Weak effect of metal type and *ica* genes on staphylococcal infection of titanium and stainless steel implants

D. Hudetz<sup>1,2</sup>, S. Ursic Hudetz<sup>1</sup>, L. G. Harris<sup>3</sup>, R. Luginbühl<sup>4</sup>, N. F. Friederich<sup>2</sup> and R. Landmann<sup>1</sup>

**Table 2.** *Staphylococcus epidermidis* adherent on titanium and stainless steel implants *ex vivo*; numbers of infected implants per number of inoculated mice and bacterial load of wild-type (WT) and *ica*<sup>-</sup> adherent *S. epidermidis* on day 14 after infection are indicated

Species	Material of infected cage	Time of infection	Biofilm-positive/WT		Biofilm-negative/ <i>ica</i> <sup>-</sup>	
			Infected implants (n)/inoculated mice (n)	Bacterial load, mean CFU/cage	Infected implants (n)/inoculated mice (n)	Bacterial load, mean CFU/cage
<i>S. epidermidis</i>	Titanium	Postoperative <sup>a</sup>	1/8	$4.00 \times 10^1$	0/3	0
		Perioperative	6/6	$1.98 \times 10^4$	3/5	$1.15 \times 10^3$
	Smooth stainless steel	Postoperative	1/6	$2.00 \times 10^1$	0/5	0
		Perioperative	3/5	$3.00 \times 10^3$	3/5	$7.33 \times 10^2$
	Rough stainless steel	Postoperative	1/4	$2.00 \times 10^1$	0/8	0
		Perioperative	4/5	$1.46 \times 10^3$	3/5	$8.67 \times 10^2$

<sup>a</sup>Postoperative infection means infection 14 days after cage implantation.

# **Infecciones asociadas a biocapas**

## **Estrategias de intervención**

- **Prevenir la contaminación del dispositivo:**
  - **Técnica aséptica**
  - **Acortando los tiempos (cateterización)**
- **Impedir la adherencia bacteriana:**
  - **Uso de materiales impregnados en antimicrobianos o antisépticos, etc.**
- **Altas dosis de antimicrobiano o etanol (catheter lock).**
- **Retirada del material.**