

Biofilms: estrategias de erradicación y de prevención de su formación



Control y prevención de la formación de biofilms

*Dra Laura Friedman
Cátedra de Microbiología*

FFyB UBA

laufriedman@hotmail.com

Infecciones crónicas, la perspectiva de los biofilms

- ✓ **Fibrosis quística**
- ✓ **Osteomielitis**
- ✓ **Endocarditis de válvulas nativas**
- ✓ **Heridas crónicas** (pie diabético, úlc. de decúbito)
- ✓ **Periodontitis, caries dental**
- ✓ **Otitis media**
- ✓ **Sinusitis**

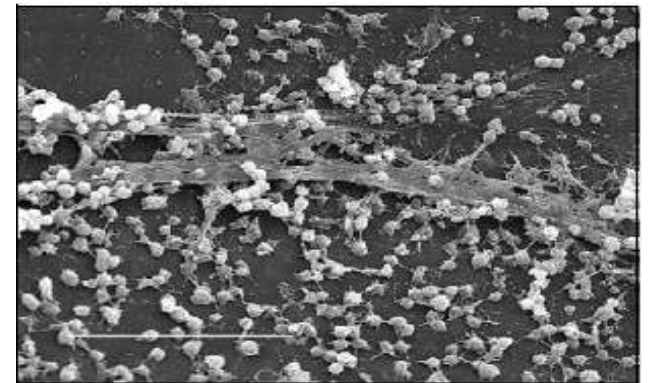
Infecciones asociadas a dispositivos médicos y los biofilms

- ✓ Prótesis de cadera
- ✓ Válvulas cardíacas
- ✓ Catéteres centrales
- ✓ Catéteres urinarios

INFECCION INTRAHOSPITALARIA

Instrumental y superficies

- ✓ Máquinas de diálisis
- ✓ Respiradores





Características comunes

- ✓ **Presencia de daño tisular o cuerpos extraños - biomateriales**
- ✓ **Colonización por microorganismos capaces de formar biofilms**
- ✓ **Resistencia mediada por el biofilm a la terapia antibiótica y a los mecanismos de defensa del hospedador**
- ✓ **Infecciones persistentes con episodios recurrentes**
- ✓ **Inflamación – tejido celular lesionado - necrosis**



Estrategias para la eliminación de biofilms en superficies inanimadas



Efecto de los desinfectantes sobre los biofilms, el problema de la resistencia, tolerancia o recalcitrancia

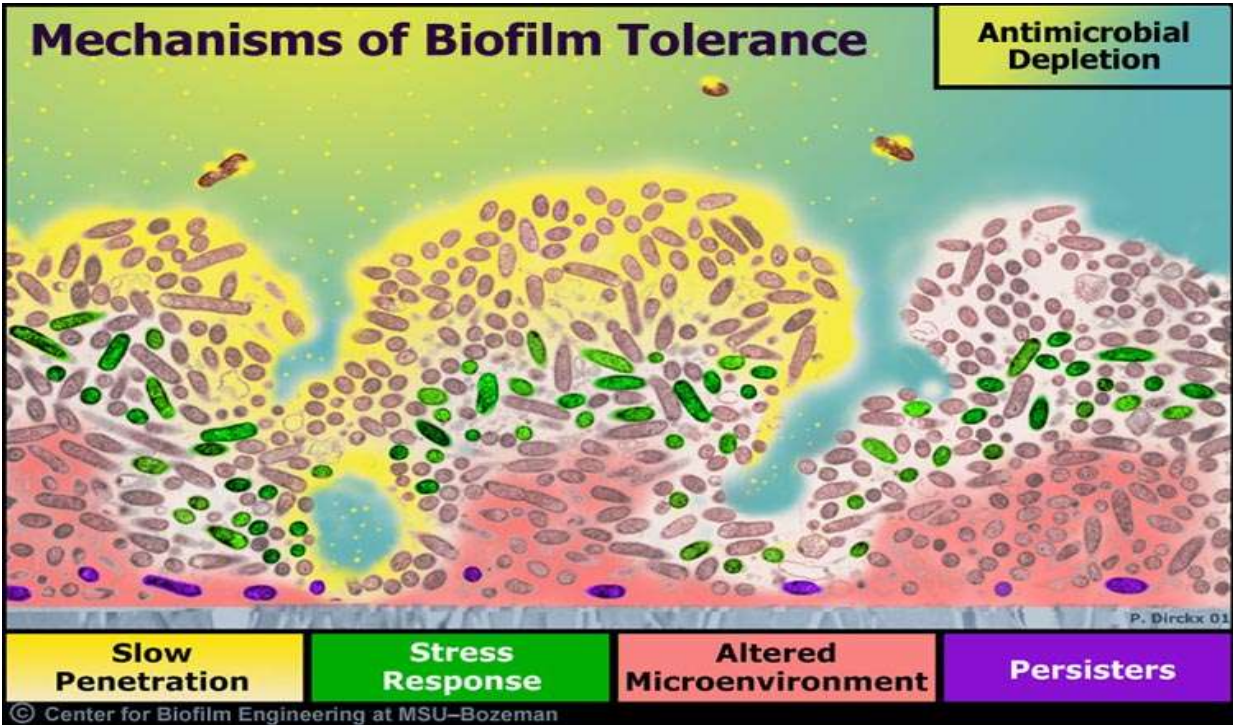
- ✓ Es un problema similar al descrito para los antibióticos
- ✓ Los mecanismos están poco caracterizados

Un fenómeno multifactorial

- ✓ **La matriz de EPS** como una barrera física y química que previene la penetración.
- ✓ Las bacterias presentes en las **capas superficiales** “**absorben el daño**” y protegen a las situadas en el interior.
- ✓ **La generación de gradientes de concentración de pH, oxígeno y nutrientes**, que crean diferentes microambientes
- ✓ La menor **velocidad de crecimiento de las bacterias**,
- ✓ La existencia de un **fenotipo específico del biofilm**
- ✓ La mayor proporción de **individuos persistentes en los biofilms**, con muy baja actividad metabólica.

Mechanisms of Biofilm Tolerance

Antimicrobial Depletion



Estudios comparativos del efecto de desinfectantes

Table 1. Resistance coefficients of biofilm cells compared to planktonic cells, obtained from studies involving the use of commonly used disinfectants.

Biocide	Strains	Rc	Rt	References	Biofilm formation method
Benzalkonium chloride	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1000		Ntsama-Essomba et al. (1997)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	100		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	250		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		2160	Grobe et al. (2002)	Alginate gel bead substrate in agitated medium
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	50		Luppens et al. (2002)	Continuous flow conditions on glass coupons
Benzalkonium chloride C12	<i>Listeria monocytogenes</i>		> 20	Frank and Koffi (1990)	Static conditions on glass slides
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	10		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C12	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C14	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C16	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C18	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Cetrimide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	> 400		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	> 400		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in PVC tubing
Chlorine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		290	Grobe et al. (2002)	Alginate gel beads in agitated broth medium
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	20		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	5		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Sodium hypochlorite	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	5		Ntsama-Essomba et al. (1997)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	500		Luppens et al. (2002)	Continuous flow conditions on glass coupons
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	38		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
Hydrogen peroxide	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	> 2		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>		> 60	Stewart et al. (2001)	Continuous flow conditions on stainless steel coupons
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	1		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
Peracetic acid + hydrogen peroxide	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	1		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	40		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
Chlorosulfamate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	4		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	25		Ntsama-Essomba et al. (1997)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>		> 60	Stewart et al. (2001)	Continuous flow conditions on stainless steel coupons
Glutaraldehyde	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	1.15		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	2		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		30	Grobe and Stewart (2000)	alginate gel bead supports in agitated medium
Chlorhexidine digluconate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		47	Grobe et al. (2002)	alginate gel bead supports in agitated medium
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
Silver nitrate	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	4.2		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	12		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
Ethanol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	1		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	1		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Origanol	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
Tea tree oil	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	0.125		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	16		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
Eucalyptus oil	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate

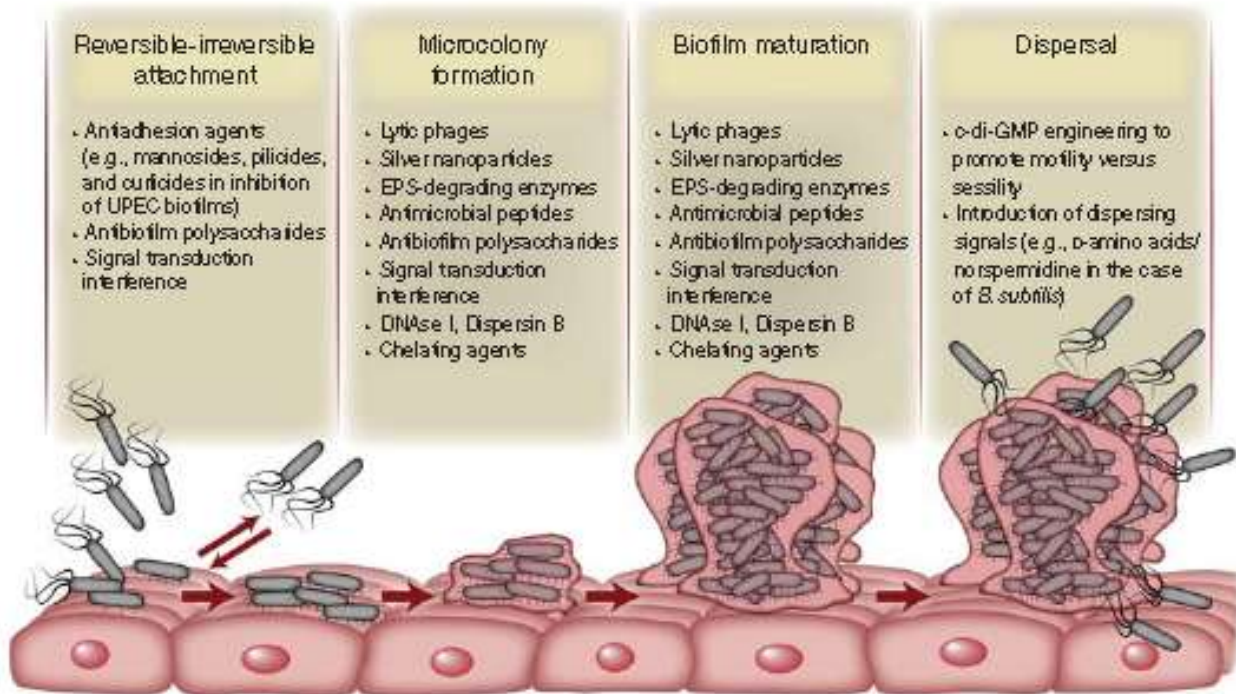
Análisis

- ✓ Comparación de efecto biocida planctónico vs biofilms por relación de concentraciones (R_c) o relación de tiempos (R_t) para alcanzar la misma reducción de la población microbiana
- ✓ Fuerte dependencia del microorganismo y el agente probado
- ✓ Metodologías estandarizadas para cuantificar la resistencia? (MBEC)

Perspectivas

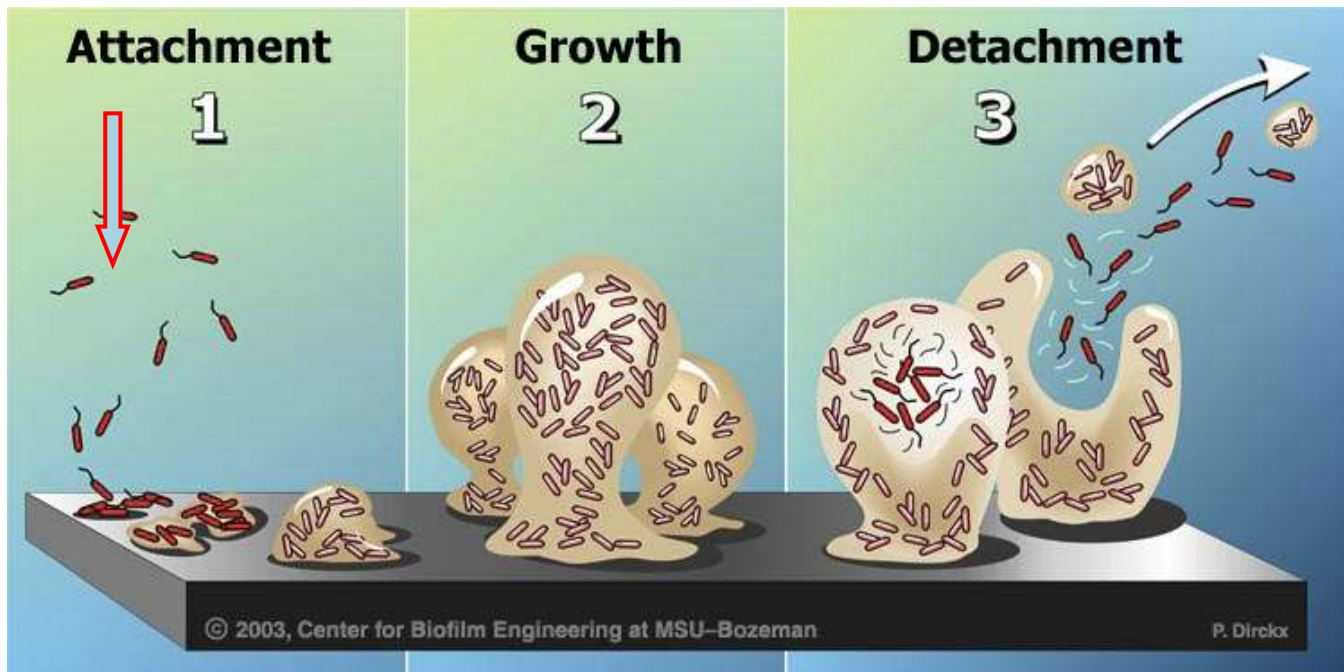
- ✓ **Destrucción de la matriz de EPS para desnaturalizar la estructura del biofilm: detergentes enzimáticos, enzimas que degradan exopolisacáridos (dispersina B), agentes que inducen la dispersión del biofilm**
- ✓ **Procesos térmicos (50 a 80 °C)**
- ✓ **Tecnologías de gas plasma**

Una visión global de la prevención de la formación de biofilms

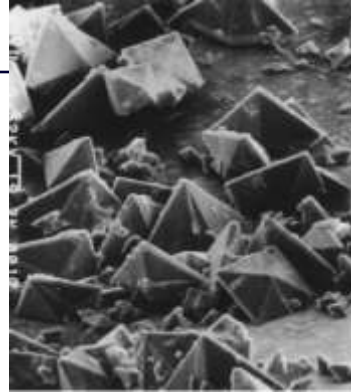
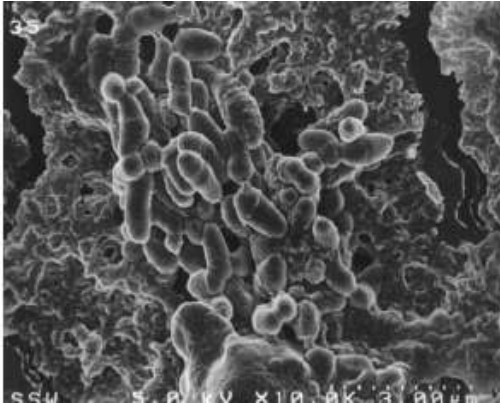


Inhibición de la formación de biofilms

- ✓ Es necesario inhibir las fases iniciales de la formación de biofilms



Catéteres urinarios



Sofer y Denstedt 2000

- 1. Adsorción de proteínas, formación superficie condicionada**
- 2. Adhesión inicial (reversible) de microorganismos**
- 3. Formación de biofilm**
- 4. Elevación del pH en biofilm y orina (bacterias con actividad ureasa)**
- 5. Formación de cristales de hidroxapatita y struvita**
- 6. Incrustación y obstrucción**

Estrategias preventivas para catéteres

- ✓ **Manipulación hidrofobicidad – hidrofiliidad del material.**
- ✓ **Materiales con mejor perfil de biocompatibilidad, flexibilidad y resistencia**
- ✓ **Recubrimiento con biocidas y/o antimicrobianos (sales de plata, nitrofurazona minociclina, rifampicina, etc)**

Estrategias preventivas para prótesis

- ✓ **Recubrimiento prótesis con materiales biodegradables que incluyen antibióticos (gentamicina)**
- ✓ **Recubrimiento de prótesis con hidroxiapatita (biomimético) con antibióticos (tetraciclina, tobramicina, vancomicina)**
- ✓ **Inclusión de antibióticos en el cemento.**

Un nuevo concepto para el control de la formación

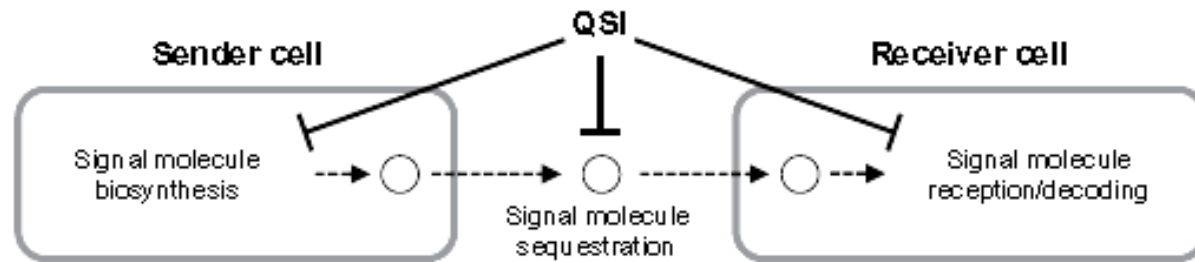
Visión tradicional



Drogas antipatogénicas

Blancos:

- ✓ sistemas regulatorios de la expresión de factores de virulencia
- ✓ Sistemas de quorum-sensing (QS)
- ✓ Se denominan inhibidores de quorum-sensing (QSI) o quorum quenching (QQ)



Rampioni *et al* 2014

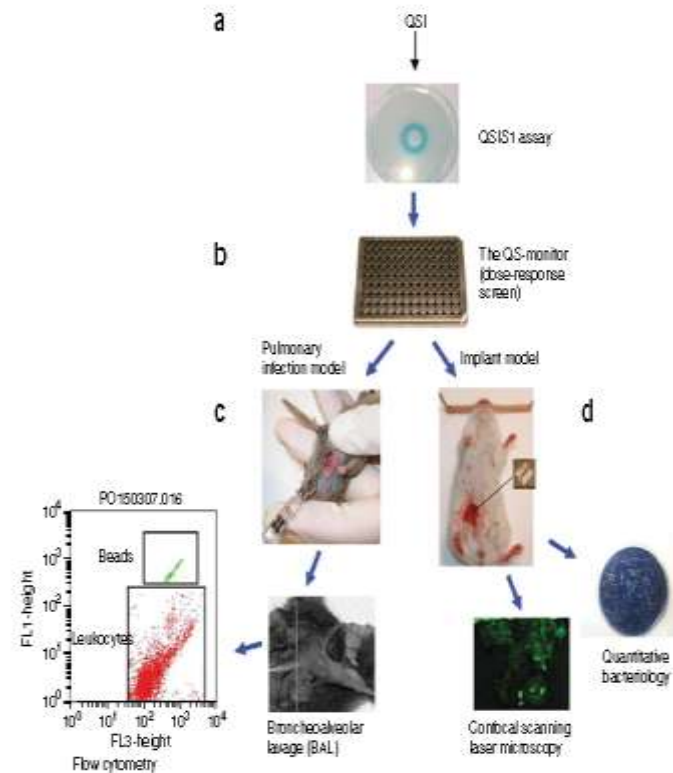
Sustancias que interfieren en la formación de biofilms

- ✓ actúan en los estadios de maduración
- ✓ interfieren en la comunicación inter e intra celular

Los efectos se evalúan en concentraciones que no inhiben el crecimiento planctónico (sub-CIM)

Métodos para la identificación de sustancias con actividad QSI

1. **Detección de actividad QSI con microorganismos biosensores**
2. **Estudio del efecto sobre la formación de biofilms y fenotipos regulados por QS en especies patógenas**
3. **Ensayos de virulencia en modelos animales**



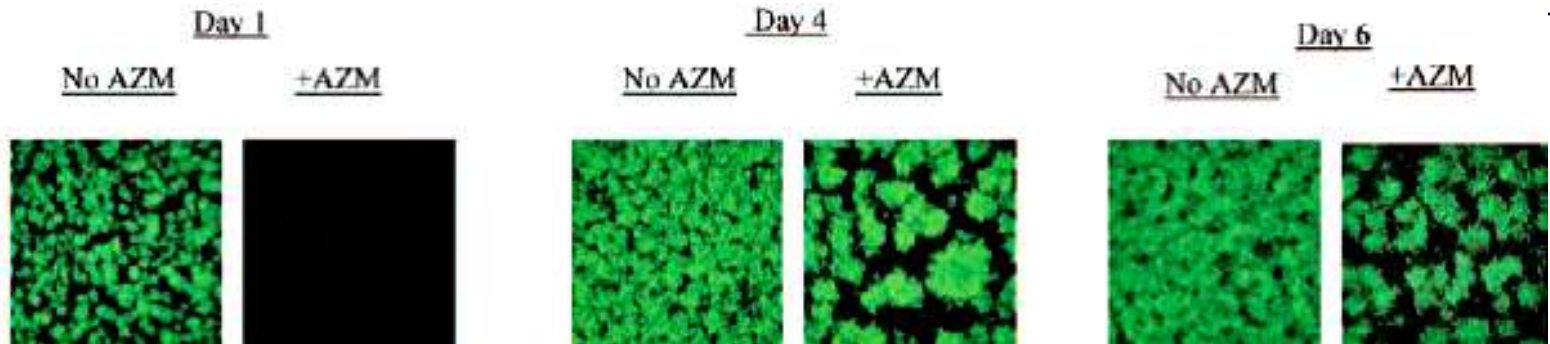


Biosensor *Agrobacterium tumefaciens*



Biosensor *Chromobacterium violaceum*

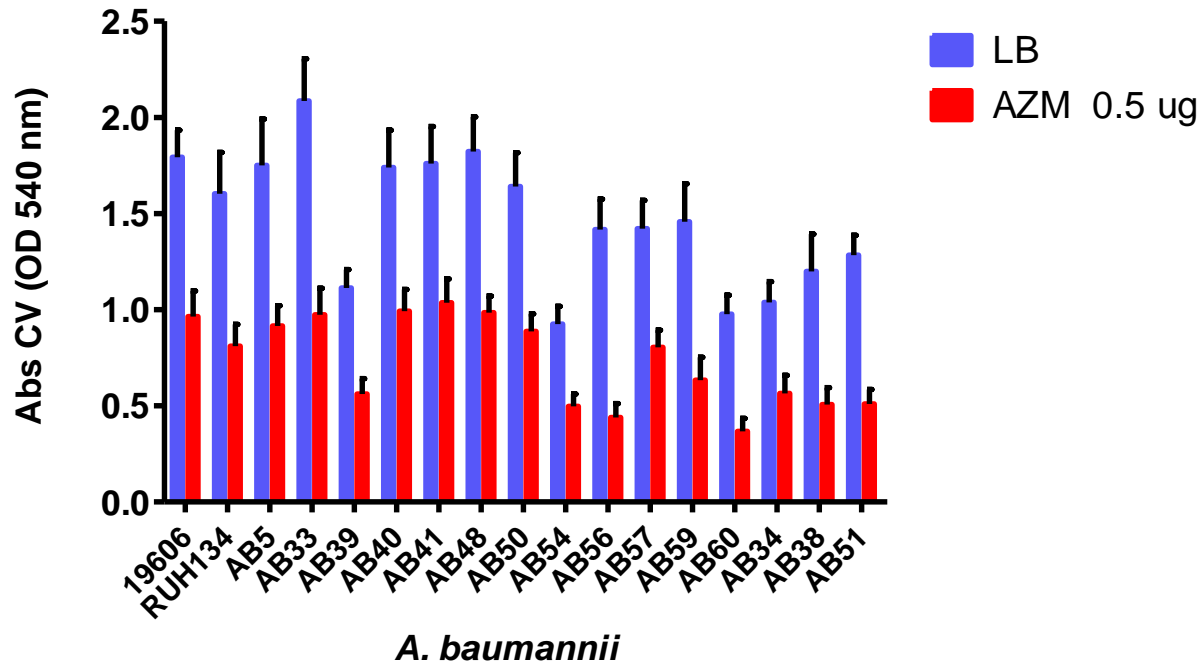
Efecto de los macrólidos, Azitromicina (AZM)



Gillis *et al* 2005

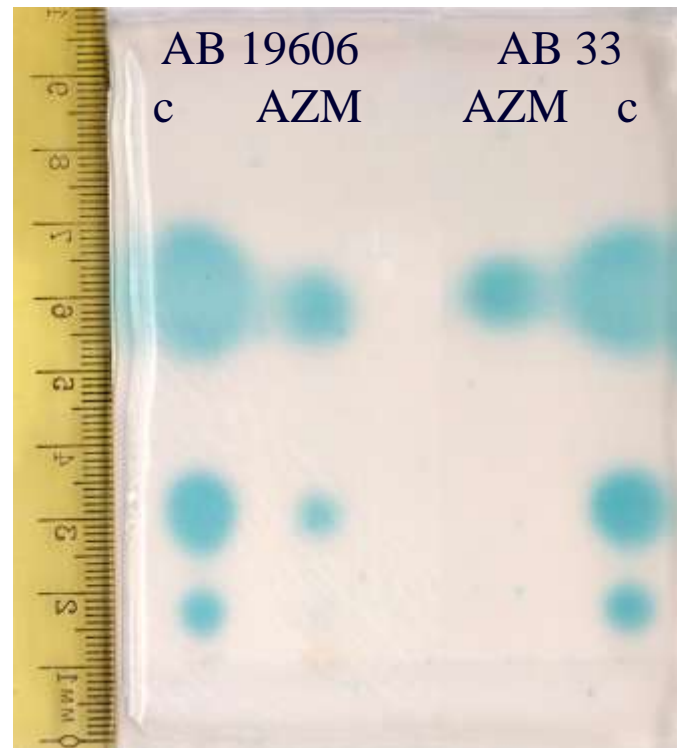
- ✓ **Retarda y disminuye la formación de biofilms** en *Pseudomonas aeruginosa*
- ✓ **Actividad anti quorum-sensing:** mayor sensibilidad al stress oxidativo, menor expresión de factores de virulencia regulados por QS y menor motilidad asociada a superficies.

Efecto de AZM en la formación de biofilms de *Acinetobacter baumannii*



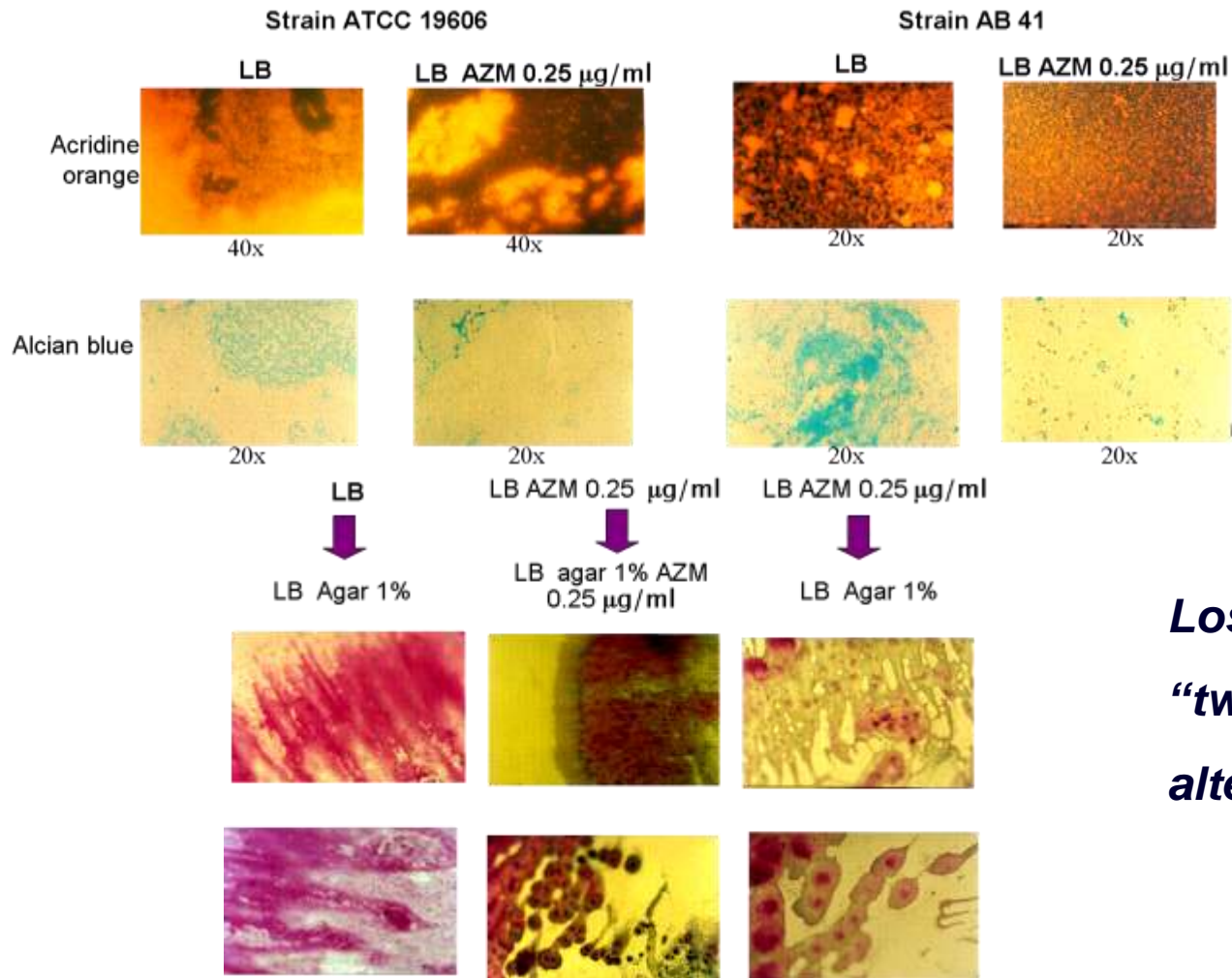
En concentraciones subCIM se observó disminución de la formación de biofilm

Perfil de autoinductores tipo HSL en presencia de AZM



En los sobrenadantes de cultivo se observó menos producción de HSL

Continuación: microscopía de biofilms y motilidad “twitching”

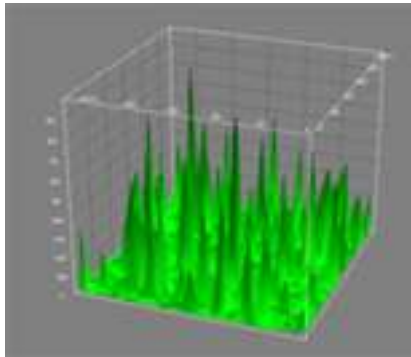
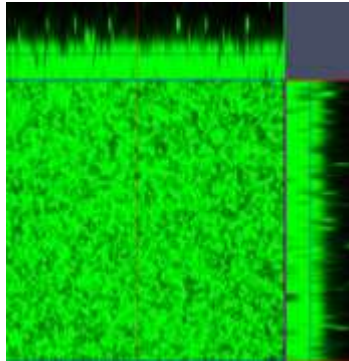


Se observaron microcolonias pequeñas y menos producción de exopolisacáridos

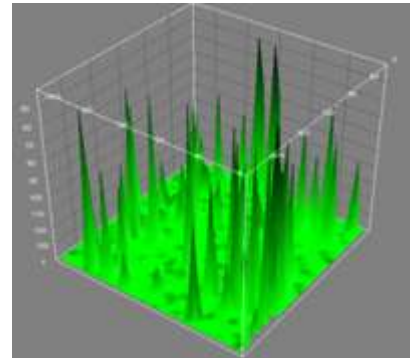
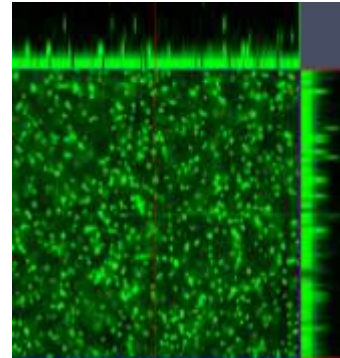
Los patrones de “twitching” presentaron alteraciones

Continuación: Microscopía confocal

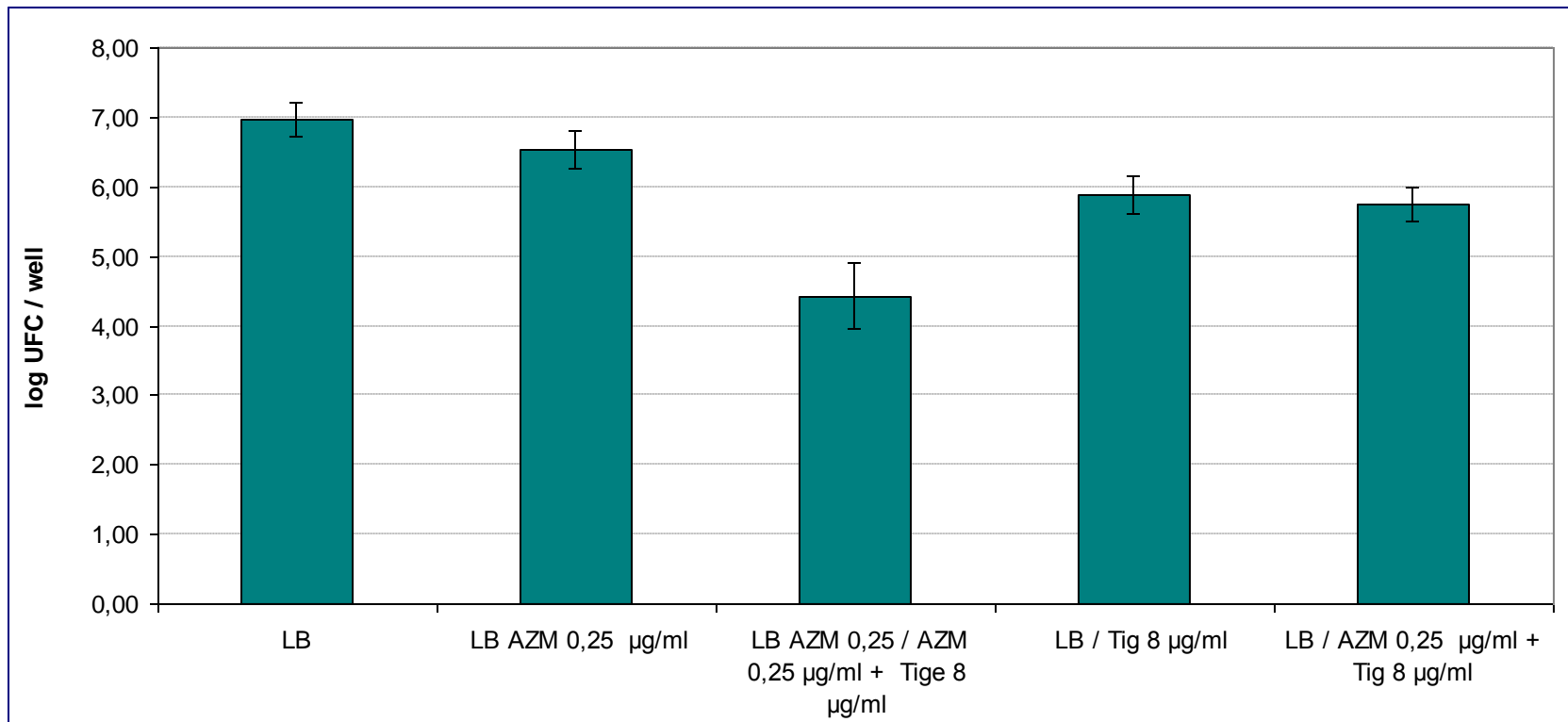
A. baumannii biofilms



A. baumannii biofilms AZM 0.5 ug/ml



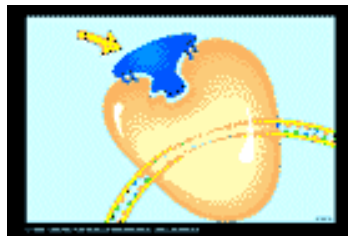
Efecto sobre la susceptibilidad en el biofilm



Los biofilms preformados en presencia de AZM son más sensibles al antibiótico tigeciclina

Inhibidores del Quorum sensing (QSI)

- ✓ **Mecanismos**
- ✓ Bloqueo biosíntesis ej: S-adenosilhomocisteína
- ✓ Inactivación moléculas: lactonasas microbianas, producción de ácido hipobromoso o hipocloroso en algas.
- ✓ **Interferencia con el receptor por moléculas análogas**

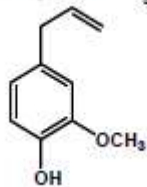


Continuación inhibidores de QS

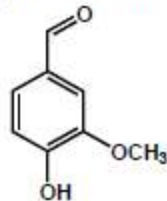
- ✓ **Inhibidores naturales:**
- ✓ Furanonas: macroalga *Delisea pulchra*
- ✓ Patulina: *Penicillium radicum*
- ✓ Extractos vegetales
- ✓ **Actividad *in vitro* e *in vivo***
- ✓ Furanonas y patulina son sustancias tóxicas para uso en humanos

La búsqueda de nuevos QSI a partir de productos naturales

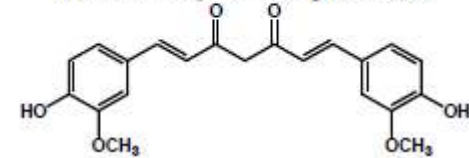
eugenol (various species)



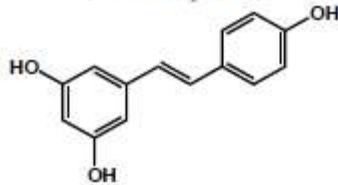
vanillin
(*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews—Orchidaceae)



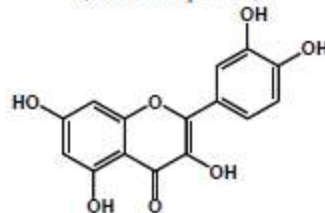
curcumin
(*Curcuma longa* L.—Zingiberaceae)



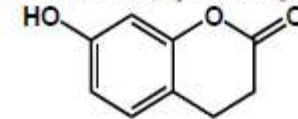
resveratrol
(various species)



quercetin
(various species)



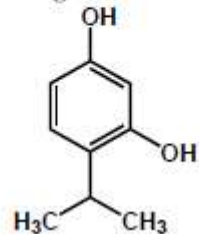
umbelliferone (Apiaceae species)



Monoterpenes

thymol

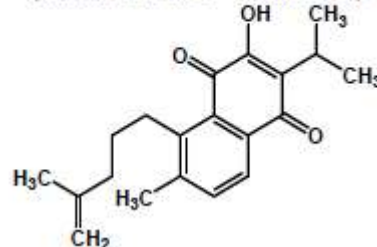
(*Thymus vulgaris* L.—Lamiaceae)



Sesquiterpenes

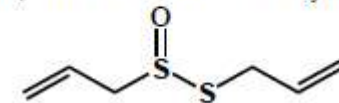
salvipipone

(*Salvia sclarea* L.—Lamiaceae)



Sulfur-Containing Compounds

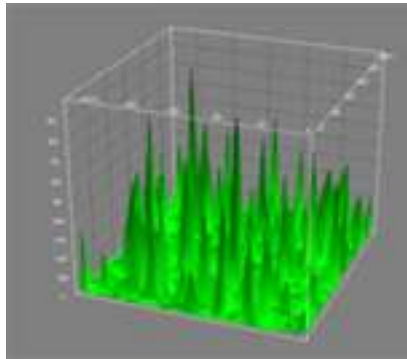
allicin (*Allium sativum* L.—Amaryllidaceae)



Estudios comparativos del efecto de desinfectantes

Table 1. Resistance coefficients of biofilm cells compared to planktonic cells, obtained from studies involving the use of commonly used disinfectants.

Biocide	Strains	Rc	Rt	References	Biofilm formation method
Benzalkonium chloride	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1000		Ntsama-Essomba et al. (1997)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	100		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	250		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		2160	Grobe et al. (2002)	Alginate gel bead substrate in agitated medium
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	50		Luppens et al. (2002)	Continuous flow conditions on glass coupons
Benzalkonium chloride C12	<i>Listeria monocytogenes</i>		> 20	Frank and Koffi (1990)	Static conditions on glass slides
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	10		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C12	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C14	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C16	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Benzalkonium chloride C18	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	> 50		Campanac et al. (2002)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Cetrimide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	> 400		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	> 400		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in PVC tubing
Chlorine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		290	Grobe et al. (2002)	Alginate gel beads in agitated broth medium
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	20		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	5		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Sodium hypochlorite	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	5		Ntsama-Essomba et al. (1997)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	500		Luppens et al. (2002)	Continuous flow conditions on glass coupons
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	38		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
Hydrogen peroxide	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	> 2		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>		> 60	Stewart et al. (2001)	Continuous flow conditions on stainless steel coupons
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	1		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
Peracetic acid + hydrogen peroxide	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	1		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	40		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
Chlorosulfamate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	4		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	25		Ntsama-Essomba et al. (1997)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>		> 60	Stewart et al. (2001)	Continuous flow conditions on stainless steel coupons
Glutaraldehyde	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	1.15		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	2		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		30	Grobe and Stewart (2000)	alginate gel bead supports in agitated medium
Chlorhexidine digluconate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ERC1		47	Grobe et al. (2002)	alginate gel bead supports in agitated medium
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
Silver nitrate	<i>Mycobacterium marinum</i> (clinical isolate)	4.2		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (clinical isolate)	12		Bardouniotis et al. (2003)	MBEC TM assay system on rocking platform
Ethanol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	1		Dubois-Erisonnet et al. (1995)	Static conditions on stainless steel coupons
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	1		Ntsama-Essomba et al. (1995)	Continuous flow conditions in Tygon PVC tubing
Origanol	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Nostro et al. (2007)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
Tea tree oil	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	0.125		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	16		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate
Eucalyptus oil	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4		Karpanen et al. (2008)	Static conditions in polystyrene microtitre plate



Muchas gracias