

Biofilms bacterianos e infección

Bacterial biofilms and infection

I. Lasa¹, J. L. del Pozo², J. R. Penadés³, J. Leiva²

RESUMEN

En los países desarrollados tendemos a pensar que las principales causas de mortalidad son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer en sus múltiples modalidades. Sin embargo, los datos en Europa resultan elocuentes; las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad (14,9 millones de muertes), después de las enfermedades cardiovasculares (16,9 millones de muertes) y causan el doble de muertes que el cáncer (7,1 millones de muertes) (datos del *World Health Organization*, WHO, 2002). Los agentes infecciosos responsables de mortalidad en el hombre han ido evolucionando a medida que las medidas higiénicas y las técnicas médicas han ido evolucionando. Actualmente, las enfermedades infecciosas agudas causadas por bacterias patógenas especializadas como la difteria, tétanos, peste, cólera o la tosferina, que representaban la principal causa de muerte a principios del siglo XX, han sido controladas gracias a la acción de los antibióticos y de las vacunas. En su lugar, más de la mitad de las infecciones que afectan a pacientes ligeramente inmunocomprometidos son producidas por bacterias ubicuas, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Ejemplos de estas infecciones son la otitis media, endocarditis de válvulas nativas, infecciones urinarias crónicas, infecciones de próstata, osteomielitis y todas las infecciones relacionadas con implantes. El análisis directo de los implantes y tejidos de estas infecciones muestra claramente que en la mayoría de los casos la bacteria responsable de la infección crece adherida sobre el tejido o el implante formando comunidades de bacterias a las que se les ha denominado "biofilms". Dentro del biofilm, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos. En este artículo se describe el papel que juegan los biofilms en infecciones humanas persistentes.

Palabras clave. Biofilms. Infecciones crónicas. Exopolisacáridos. Implantes médicos. Resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

In developed countries we tend to think of heart disease and the numerous forms of cancer as the main causes of mortality, but on a global scale infectious diseases come close, or may even be ahead: 14.9 million deaths in 2002 compared to cardiovascular diseases (16.9 million deaths) and cancer (7.1 million deaths) (WHO report 2004). The infectious agents responsible for human mortality have evolved as medical techniques and hygienic measures have changed. Modern-day acute infectious diseases caused by specialized bacterial pathogens such as diphtheria, tetanus, cholera, plague, which represented the main causes of death at the beginning of XX century, have been effectively controlled with antibiotics and vaccines. In their place, more than half of the infectious diseases that affect mildly immunocompromised patients involve bacterial species that are commensal with the human body; these can produce chronic infections, are resistant to antimicrobial agents and there is no effective vaccine against them. Examples of these infections are the otitis media, native valve endocarditis, chronic urinary infections, bacterial prostatitis, osteomyelitis and all the infections related to medical devices. Direct analysis of the surface of medical devices or of tissues that have been foci of chronic infections shows the presence of large numbers of bacteria surrounded by an exopolysaccharide matrix, which has been named the "biofilm". Inside the biofilm, bacteria grow protected from the action of the antibodies, phagocytic cells and antimicrobial treatments. In this article, we describe the role of bacterial biofilms in human persistent infections.

Key words. Biofilms. Chronic Infection. Exopolysaccharides. Medical devices. Antibiotic resistance.

An. Sist. Sanit. Navar. 2005; 28 (2): 163-175.

1. Laboratorio de Biofilms Microbianos. Instituto de Agrobiotecnología. Universidad Pública de Navarra-CSIC. Pamplona.

2. Servicio de Microbiología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

3. Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Cardinal Herrera-CEU. Moncada. Valencia.

Correspondencia:

Íñigo Lasa Uzcudun

Laboratorio de Biofilms Microbianos. Instituto de Agrobiotecnología.

Universidad Pública de Navarra-CSIC

Ctra. de Mutilva Baja, s/n

31192 Mutilva Baja (Navarra)

Tfno. 948 168007

Fax: 948 232191

E-mail:ilasa@unavarra.es

DEFINICIÓN DE BIOFILM

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Fig. 1)¹. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. ¿Quién no ha observado el material mucoso que recubre un jarrón en el que hemos tenido depositadas flores, el material resbaladizo que recubre las piedras de los lechos de los ríos, los cascos de los barcos o la superficie interna de una tubería? Otro ejemplo cotidiano de biofilm lo constituye la placa dental, cada día nos esforzamos por combatir la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar un desarrollo excesivo de microorganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos². En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias³.

En los primeros trabajos sobre la estructura del biofilm, una de las cuestiones que surgía con mayor reiteración era cómo las bacte-

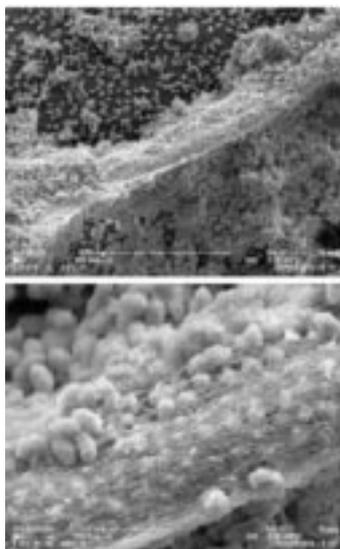


Figura 1. Fotografía de microscopia de barrido de un biofilm de *Salmonella enteritidis*.

rias del interior del biofilm podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno. Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio^{1,4,5}.

ETAPAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DEL BIOFILM

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie (Fig. 2). En bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria⁶. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria^{7,8}. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celu-

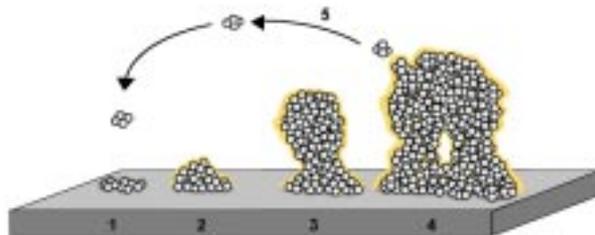


Figura 2. Esquema mostrando las etapas en el proceso de formación del biofilm.

losa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado "Pellican".

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde el biofilm es el proceso que menos se conoce. En el caso de *Staphylococcus aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón (*icaADBC*) responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm. El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de 10^{-6} y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y poder escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto del IS desde el operón *ica* provocará una nueva variación de fase⁹. Otra alternativa descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para el proceso de formación del biofilm¹⁰. En *Actinobacillus actinomycetecomitans* se ha descrito una actividad enzimática, denominada dispersina que degradan de forma específica el exopolisacárido de la matriz del biofilm. La presencia en distintos genomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas), que podrían ser responsables de una función similar, sugiere que la degradación controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias del biofilm¹¹⁻¹³.

REGULACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DEL BIOFILM

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Un trabajo pionero con *P. aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas el autoinductor son péptidos. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. En relación con el *quorum sensing*, se ha identificado una molécula denominada "Furanona" producida por el alga *Delisea pulcra*, con una estructura

similar a las acylhomoserina lactonas. Estas moléculas se unen a los mismos receptores, pero en lugar de activarlos, los bloquean, inhibiendo la consiguiente formación de biofilm^{14,15}. En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación del biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que inhibe un sistema de *quorum-sensing* y el proceso de formación del biofilm¹⁶.

Además del *quorum sensing*, otros reguladores globales como CsrA en *E. coli*, CytR de *V. cholerae*, se ha demostrado que son determinantes importantes para el desarrollo de biofilm de estas bacterias. En *S. aureus*, nuestro grupo ha demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm de esta bacteria. Este trabajo demuestra por primera vez que un regulador de virulencia es a su vez un regulador de la formación del biofilm, sirviendo de conexión entre ambos procesos¹⁷.

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm. Así, la activación de la síntesis de celulosa en *S. typhimurium* se produce por el activador alostérico c-diGMP [17]. La concentración de este activador depende de dos actividades enzimáticas, diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los dominios GGDEF y EAL¹⁸. En *S. typhimurium* existen al menos 21 proteínas que contienen estos dominios, y se desconoce si todas estas proteínas afectan a la regulación del proceso de síntesis de celulosa en distintas condiciones ambientales o si son responsables de otras funciones¹⁹. En *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gluconacetobacter xylinum*, también se han descrito proteínas con dominio GGDEF implicadas en la formación del biofilm, indicando que esta molécula es un transmisor secundario de señal común al proceso de regulación de la producción de exopolisacáridos en bacterias^{20,22}.

Finalmente, parece lógico que la formación de biofilm se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos-componentes (*two-component systems*) que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental. En un trabajo reciente, nuestro grupo ha demostrado que de los 16 sistemas de dos-componentes presentes en *S. aureus*, únicamente el sistema *arlRS* y el sistema *agr* parecen regular negativamente el proceso de formación del biofilm *in vitro*²³.

BIOFILMS E INFECCIÓN

Aunque normalmente se asocian los biofilms bacterianos con procesos infecciosos, es necesario señalar que algunos biofilms tienen un papel protector. Así, los biofilms de lactobacilos presentes en la vagina fermentan el glucógeno producido por las células epiteliales al ser inducidas por los estrógenos, produciendo ácidos que disminuyen el pH vaginal y previenen de esa manera la colonización por microorganismos patógenos. La desaparición de este biofilm con la consiguiente neutralización del pH suele venir acompañada del desarrollo de microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos anaerobios. Otro ejemplo de biofilms benefi-

ciosos lo constituye los biofilms formados sobre la superficie de los dientes, que protegen frente a la colonización por otros patógenos exógenos. Este biofilm suele estar compuesto en una persona por 20-30 especies bacterianas distintas, entre las que invariablemente destacan en número los estreptococos y *Actinomyces* spp. Las bacterias de la placa dental viven en equilibrio mientras las condiciones externas se mantengan constantes. Una persona que consuma muchos alimentos o bebidas ricas en azúcares, favorecerá el desarrollo de especies bacterianas que fermentan los azúcares, desequilibrando la población bacteriana y favoreciendo el desarrollo de especies como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* spp., que producen ácidos que disuelven el esmalte protector de los dientes. La consecuencia final es el desarrollo de las dos infecciones más prevalentes en el hombre, la caries y la periodontitis.

Junto al papel beneficioso de los biofilms bacterianos, existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan los biofilms con distintos procesos infecciosos (Tabla 1)²⁴⁻²⁶. La infección asociada a tejido dañado-cuerpo-extraño-biomaterial incluye una serie de características comunes:

1. Colonización de sustratos por bacterias adhesivas formadoras de biofilm.
2. Presencia de un biomaterial, tejido dañado, o sustrato de tejido relativamente acelular.

Tabla 1. Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucrados biofilms bacterianos²⁵.

| Infección o enfermedad | Especie bacteriana formadora de biofilm |
|-------------------------------------|--|
| Caries dental | Cocos Gram positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>) |
| Periodontitis | Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas |
| Otitis media | Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i> |
| Infecciones del músculo-esqueleto | Cocos Gram positivos (ej. staphylococos) |
| Fascitis necrotizante | Streptococos Grupo A |
| Osteomielitis | Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas |
| Prostatitis bacteriana | <i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas |
| Endocarditis de la válvula nativa | Streptococos del grupo viridans |
| Neumonía por fibrosis quística | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> |
| Meloidosis | <i>Pseudomonas pseudomallei</i> |
| Infecciones nosocomiales | |
| Neumonía (cuidados intensivos) | Bacilos gram-negativos |
| Suturas | <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> |
| Orificios de salida | <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> |
| Vías arteriovenosas | <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> |
| Bucles esclerales | Cocos Gram positivos |
| Lentes de contacto | <i>P. aeruginosa</i> y cocos Gram positivos |
| Cistitis por catéteres urinarios | <i>E. coli</i> y otros bacilos Gram negativos |
| Peritonitis por diálisis peritoneal | Una variedad de bacterias y hongos |
| DIU | <i>Actinomyces israelii</i> y muchos otros |
| Tubos endotraqueales | Una variedad de bacterias y hongos |
| Catéteres hickman | <i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i> |
| Catéteres centrales venosos | <i>S. epidermidis</i> y otros |
| Válvulas mecánicas del corazón | <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> |
| Injertos vasculares | Cocos Gram positivos |
| Bloqueo del conducto biliar | Una variedad de bacterias entéricas y hongos |
| Dispositivos ortopédicos | <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> |
| Prótesis del pene | <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> |

3. Iniciación de infección por pequeños inóculos bacterianos.
4. Resistencia mediada por el biofilm bacteriano a los mecanismos de defensa del huésped y a la terapia antibiótica.
5. Infecciones causadas con mucha frecuencia por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Infecciones persistentes por resistencia al tratamiento antimicrobiano.
7. Presencia de inflamación, tejido celular dañado, y necrosis en la interfase tejido-implante (zona fibroinflamatoria, inmunoincompetente) generado por partículas debridadas del biomaterial.
8. Alteración de la respuesta mediada por células y posiblemente humoral del huésped por la presencia del biomaterial y bacterias²⁷.

A continuación vamos a describir algunos ejemplos de enfermedades infecciosas relacionados con biofilm bacterianos.

Endocarditis de válvulas nativas

Resulta de la interacción de bacterias u hongos con las válvulas mitral, aorta, tricúspide o pulmonar. Los organismos responsables, principalmente estreptococos y estafilococos que alcanzan el torrente sanguíneo desde la orofaringe, el tracto gastrointestinal o el tracto genitourinario. Estas bacterias normalmente no se adhieren sobre las válvulas intactas, pero si se produce alguna lesión sobre las mismas, las células endoteliales secretan fibronectina, que es utilizada como receptor por adhesinas específicas de la superficie de las bacterias. Las bacterias se multiplican en la lesión y forman el biofilm, lo cual acentúa el daño y puede provocar embolias sépticas. Una vez que el biofilm se ha establecido, los tratamientos antibióticos resultan poco efectivos.

Otitis media

Es una infección que afecta al oído medio, muy frecuente en niños, que puede cursar de forma aguda o crónica y que es causada por un grupo variable de microorganismos, incluyendo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Una forma de aliviar la presión sobre la membrana timpánica y aumentar la aireación es la colocación de unos tubos timpanostómicos. Estos tubos atraviesan el tímpano y sobre su superficie se adhieren bacterias formando biofilms.

Prostatitis

La glándula prostática puede infectarse por bacterias que ascienden desde la uretra o por reflujo de orina contaminada. Una vez que las bacterias entran en la próstata comienzan a multiplicarse y activan la respuesta inmune. Si la infección se trata en sus inicios, responde bien al tratamiento antibiótico y puede ser eliminada. Pero si las bacterias persisten, forman microcolonias que se adhieren al epitelio formando biofilms y dan lugar a infecciones crónicas.

Biofilms sobre implantes médicos

Los biofilms sobre implantes médicos pueden estar compuestos por bacterias Gram positivas, Gram negativas o levaduras. Estos microorganismos proceden de la piel del propio paciente, del personal sanitario o del ambiente. Pueden estar formados por una única especie o por múltiples especies, dependiendo del implante y de la duración de su uso en el paciente. Cuando un implante se contamina con bacterias varios factores influyen en que se desarrolle un biofilm sobre el mismo. Inicialmente los microorganismos deben adherirse a la superficie del implante el tiempo suficiente para que la adherencia sea irreversible. Esta adherencia depende del flujo de líquido al que está sometido el implante, del número de bacterias que se adhieren y de las características físico-químicas del implante. En el caso de catéteres venosos centrales, la superficie del catéter acaba recubierta de proteínas del plasma, y otras proteínas de los tejidos como fibronectina, fibrinógeno, laminina, etc. Estas proteínas favorecen la unión de las bacterias que posean adhesinas para las mismas. En el caso de sondas urinarias, la fuente de contaminación puede ascender desde la bolsa recolectora, entrar en el lumen del catéter a través del exudado en el punto de entrada del catéter. En este caso las bacterias se unen directamente al material del catéter sin que interviengan proteínas del paciente.

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie del implante y ha formado el biofilm, este biofilm actúa como una fuente de infección sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario.

BIOFILMS Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el implante. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido²⁸⁻³⁰.

¿Cuáles son las razones de esta mayor resistencia a los antibióticos? Las bases de la resistencia bacteriana en biofilm se están aún investigando, pero entre las razones barajadas se incluyen:

1. La barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos.

2. El crecimiento ralentizado de las bacterias del biofilm debido a la limitación de nutrientes.
3. La existencia de microambientes que antagonizan con la acción del antibiótico.
4. La activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico del biofilm que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas²⁸.

Entre todas estas posibles razones, la explicación más intuitiva para la pobre eficacia de los antibióticos contra las bacterias en biofilm es la incapacidad del antibiótico para penetrar en el biofilm a través de la matriz exopolisacáridica. Sin embargo, diferentes estudios en los que se ha medido la penetración de los antibióticos en los biofilms de *P. aeruginosa* han mostrado que la matriz del biofilm altera la velocidad de penetración de los antibióticos (las fluoroquinolonas penetran rápidamente y los aminoglucósidos más lentamente), pero en principio todos los antibióticos ensayados son capaces de penetrar hasta el interior del biofilm en unas horas y alcanzar concentraciones bactericidas para las formas planctónicas.

Un problema adicional de la práctica clínica relacionado con la resistencia de los biofilms a los antimicrobianos es la ausencia de métodos estandarizados de uso rutinario para determinar la sensibilidad de las bacterias de un biofilm a los antimicrobianos. Se han realizado intentos por adaptar métodos desarrollados en laboratorios de investigación, pero todavía no se ha adoptado ningún protocolo estándar para este fin. Entre estos métodos, destacan por su facilidad para adaptarse al diagnóstico clínico el método descrito por Amorena y col³¹ y el método denominado "Calgary biofilm system"³². En el primero método, el biofilm desarrollado sobre pocillos de placas de microtiter durante distintos períodos de tiempo, se expone a los tratamientos antimicrobianos, el número de bacterias viables que han resistido el tratamiento se cuantifica midiendo la cantidad de ATP por bioluminiscencia. El método "Calgary Biofilm Device" utiliza una placa tipo microtiter con una tapa especial. Esta tapa tiene 96 púas que se introducen y ajustan perfectamente en cada uno de los pocillos de las placas microtiter. Los biofilms formados sobre las púas de la tapa se puede llevar a otra placa para su exposición a la acción de las distintas concentraciones de antibióticos. Finalmente, el número de bacterias supervivientes se cuantifican realizando recuentos en medios de cultivo.

BIOFILM, BIOMATERIALES Y SISTEMA INMUNE

La cirugía e implantación de biomateriales desorganizan la respuesta del huésped y los mecanismos inmunes. Las superficies de los biomateriales y las partículas debridadas aumentan la susceptibilidad a la infección, activan las defensas del huésped y estimulan la liberación de mediadores inflamatorios, citoquinas, radicales oxígeno, y enzimas lisosomales, resultando en daño proteico tisular e inflamación crónica. El daño tisular puede ser posteriormente agravado por actividades bacterianas y toxinas. El exopolisacárido bacteriano también causa perturbación de la respuesta del huésped. El exopolisacárido de *S. epidermidis* parece inhibir la blastogénesis de las células B y T, la quimiotaxis de leucocitos, opsonización, y quimiolumi-

niscencia y aumentar la virulencia en ratones. Además, en presencia de implantes poliméricos colocados en cavidades peritoneales, los neutrófilos exhiben un potencial bactericida y fagocítico disminuido y una producción de superóxido reducida²⁷.

ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN FRENTE A INFECCIONES POR BIOFILMS SOBRE IMPLANTES

Los microorganismos pueden colonizar la prótesis en el momento de su colocación, por inoculación directa durante la manipulación del tejido o el implante o por contaminación aérea de la herida; y después del implante, por diseminación hematógena, durante una bacteriemia o por extensión directa, a partir de un foco adyacente de infección. La contaminación del implante en el momento de la intervención quirúrgica se puede evitar mediante quimioprofilaxis quirúrgica y/o la utilización de quirófanos dotados de flujo laminar. La posible contaminación posterior se puede evitar mediante el diagnóstico y tratamiento precoz de las infecciones y mediante el uso de quimioprofilaxis en intervenciones y procedimientos médicos que pueden llevar a bacteriemia como extracciones dentarias, sondaje, etc. El tratamiento antibiótico sistémico en general no consigue la erradicación del biofilm pero en general se debe implantar para destruir las bacterias que pasan al torrente circulatorio. El tratamiento antibiótico sistémico debe ser inicialmente de amplio espectro y debe ser sustituido por antibióticos específicos cuando el laboratorio de microbiología informe la identificación y la susceptibilidad del microorganismo causante de la infección. Dado que un número muy elevado de infecciones asociadas a implantes están causadas por bacterias Gram positivas del género estafilococo, vancomicina y teicoplanina son los antibióticos de primera elección para el tratamiento de estas infecciones.

Sin embargo, muy pocas infecciones asociadas a implante resuelven satisfactoriamente, y la recurrencia es muy común. Dado que el tratamiento antibiótico sistémico resulta ineficaz, se han utilizado distintas estrategias para el control y tratamiento de las infecciones asociadas a implantes. Como ejemplo hemos escogido los dos tipos de infecciones más frecuentes la infección asociada a catéteres intravasculares y la infección de prótesis articulares.

Tratamiento de infección asociada a catéteres intravasculares

La retirada del catéter es el tratamiento más efectivo; sin embargo, en el caso de los catéteres intravasculares tunelizados centrales la retirada puede resultar problemática y el riesgo quirúrgico que supone la retirada puede ser mayor que el riesgo asociado a un tratamiento antibiótico ineficaz. En estos casos se recomienda un tratamiento denominado de sellado antibiótico, que consiste en instilar en el interior del catéter una solución de anticoagulante (heparina o EDTA) y antibiótico a una concentración entre 100 y 1.000 veces mayor que la concentración mínima inhibitoria del microorganismo responsable de la infección asociada a catéter, durante al menos 8 horas diarias a lo largo de 10-14 días³³. Los antibióticos que mejores resultados están ofreciendo en este tipo de tratamiento son gentami-

cina, levofloxacino, cotrimoxazol, minociclina, teicoplanina y vancomicina.

El uso de catéteres impregnados con antimicrobianos o antiinfecciosos han sido otra estrategia aunque su eficiencia está en discusión. Los antibióticos/antiinfecciosos más utilizados para impregnar los catéteres son cefazolina, Chlorhex-sulfadiazina de plata, minociclina-rifampicina, impregnación de plata-iontoforesis.

Tratamiento de infecciones sobre prótesis articulares

El tratamiento de las infecciones de prótesis articulares incluye terapia antimicrobiana agresiva junto con procedimientos quirúrgicos que incluye debridamiento completo para retirar todos los materiales infectados incluyendo el segmento y los tejidos desvitalizados y el hueso. En la mayor parte de los casos los intentos para salvar la prótesis son infructuosos y es necesaria la retirada del implante junto con una pauta antimicrobiana apropiada de larga duración y posterior reimplantación de la prótesis articular³⁴.

Recientemente un consorcio de bioquímicos, microbiólogos, cirujanos e ingenieros de sistemas microelectromecánicos se han unido para desarrollar un implante inteligente que sería capaz de detectar la presencia en la superficie de patógenos bacterianos, bloquear sus sistemas de transducción de señal y tratar la infección incipiente con altas dosis de antibióticos localizados y comunicar los resultados de las acciones tomadas al personal responsable del cuidado del paciente a través de telemetría³⁵. Este es un ejemplo ilustrativo de cómo diferentes disciplinas pueden ofrecer soluciones imaginativas a las infecciones asociadas a implantes en un futuro no muy lejano.

CONCLUSIONES

Las bacterias han crecido en biofilms durante millones de años, como parte de una estrategia exitosa para colonizar el planeta y la mayoría de los seres vivos. Nosotros sólo hemos reconocido esta forma de vida de las bacterias en las últimas dos décadas. La formación de biofilms representa un problema para aquellos pacientes que requieran un implante. Los microorganismos del biofilm son muy difíciles de tratar con agentes antimicrobianos y la liberación de bacterias desde el biofilm puede provocar una infección, sobre todo si el paciente está inmunocomprometido. Es necesario desarrollar nuevos métodos para detectar la presencia de biofilms en el implante y nuevos métodos para evaluar la respuesta frente a las estrategias de control. Finalmente, necesitamos desarrollar nuevas estrategias de control que en combinación con los antibióticos nos ayuden a combatir biofilms ya formados. Todos los esfuerzos dirigidos a la identificación de genes que sean necesarios para la formación del biofilm, la búsqueda de enzimas capaces de degradar específicamente la matriz polisacáridica del biofilm, métodos físicos como ultrasonidos que perturben la estabilidad de la matriz o los estudios dirigidos a descifrar los patrones de expresión génica entre las bacterias plactónicas y las bacterias del biofilm deben de ser considerados como fuente de posibles estrategias que nos ayudarán a comprender y combatir mejor las infecciones producidas por biofilms bacterianos.

Agradecimientos

Financiado con los proyectos BIO2002-04542-C02 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, "Beca Ortiz de Landazuri" del Departamento de Salud del Gobierno de Navarra y proyecto FIS PI031102 del Ministerio de Sanidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
2. SUTHERLAND I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147: 3-9.
3. BRANDA SS, VIK S, FRIEDMAN L, KOLTER R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13: 20-26.
4. DAVEY ME, O'TOOLE GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
5. STOODLEY P, SAUER K, DAVIES DG, COSTERTON JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
6. O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
7. CUCARELLA C, SOLANO C, VALLE J, AMORENA B, LASA I, PENADES JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183: 2888-2896.
8. TOLEDO-ARANA A, VALLE J, SOLANO C, ARRIZUBIETA MJ, CUCARELLA J, LAMATA M et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4538-4545.
9. ZIEBUHR W, KRIMMER V, RACHID S, LOSSNER I, GOTZ F, HACKER J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999; 32: 345-356.
10. UBEDA C, TORMO MA, CUCARELLA C, TROTONDA P, FOSTER TJ, LASA I et al. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 2003; 49: 193-210.
11. KAPLAN JB, RAGUNATH C, RAMASUBBU N, FINE DH. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol* 2003; 185: 4693-4698.
12. KAPLAN JB, RAGUNATH C, VELLIYAGOUNDER K, FINE DH, RAMASUBBU N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2633-2636.
13. KAPLAN JB, VELLIYAGOUNDER K, RAGUNATH C, ROHDE H, MACK D, KNOBLOCH JK et al. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 2004; 186: 8213-8220.
14. WU H, SONG Z, HENTZER M et al. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 1054-1061.
15. HUME EB, BAVEJA J, MUIR B, SCHUBERT TL, KUMAR N, KJELLEBERG S et al. The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. *Biomaterials* 2004; 25: 5023-5030.
16. GOV Y, BITLER A, DELL'ACQUA G, TORRES JV, BALABAN N. RNIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. *Peptides* 2001; 22: 1609-1620.

17. VALLE J, TOLEDO-ARANA A, BERASAIN C, GHIGO JM, AMORENA B, PENADES B et al. SarA and not 6^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1075-1087.
18. AUSMEES N, MAYER R, WEINHOUSE H, VOLMAN G, AMIKAM D, BENZIMAN M et al. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204: 163-167.
19. GARCIA B, LATASA C, SOLANO C, PORTILLO FG, GAMAZO C, LASA I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004; 54: 264-277.
20. BOMCHIL N, WATNICK P, KOLTER R. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J Bacteriol* 2003; 185: 1384-1390.
21. TISCHLER AD, CAMILLI A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004; 53: 857-869.
22. KIRILLINA O, FETHERSTON JD, BOBROV AG, ABNEY J, PERRY RD. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 2004; 54: 75-88.
23. TOLEDO-ARANA A, MERINO N, VERGARÁ M, DEBARBOUILLE M, PENADES JR, LASA I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative *ica*-independent biofilm in the absence of *arlRS* two-component system. *J Bacteriol* 2005; In press.
24. COSTERTON JW, STEWART PS. Biofilms and device-related infections. En: Nataro JP, Blaser MJ, Cunningham-Rundles S, eds. *Persistent Bacterial Infections*. Washington: American Society of Microbiology 2000: 423-439.
25. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
26. WILSON M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 2001; 84: 235-254.
27. GRISTINA AG. Biofilms and chronic bacterial infections. *Clin Microbiol Newsletter* 1994; 16: 171-178.
28. MAH TF, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-39.
29. STEWART PS, COSTERTON JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
30. DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
31. AMORENA B, GRACIA E, MONZÓN M et al. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chem* 1999; 44: 43-55.
32. CERI H, OLSON ME, STREMICK C, READ RR, MORCK D, BURET A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1771-1776.
33. MESSING B. Catheter-sepsis during home parenteral nutrition: use of the antibiotic-lock technique. *Nutrition* 1998; 14: 466-468.
34. STECKELBERG JM, ROUSE MS, TALLAN BM, OSMON DR, HENRY NK, WILSON WR. Relative efficacies of broad-spectrum cephalosporins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 554-558.
35. EHRLICH GD, ZE HU F, LIN A, COSTERTON JW, POST JC. Intelligent implants to battle biofilms. *ASM News* 2004; 70: 127-133.

