Sensibilidad de *Stahylococcus aureus* a los antibióticos tras su crecimiento en biofilms

E. Gracia[1,2], M. Monzón[1], M. Pérez[1] y B. Amorena[1]

[1]CSIC. Unidad de Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agraria (Diputación General de Aragón), Aptdo. 727, Zaragoza ; [2]Dirección actual: Exopol, S.L. (Autovacunas), nave 12 María de Luna 11, 50015 Zaragoza

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS. Se ha determinado la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a distintos antibióticos cuando crece formando biofilms, evaluándose la viabilidad bacteriana de manera automatizada, por bioluminiscencia. El estudio puede contribuir a mejorar la elección de antibióticos, especialmente frente a infecciones crónicas, por ejemplo, en el caso de las infecciones post-quirúrgicas en el hombre, así como la mastitis de rumiantes y las estafilococias de conejos en el ámbito ganadero, procesos con una importante repercusión productiva.

MATERIAL Y METODOS. Cepas. Se emplearon 4 cepas de *S. aureus* (72, 80, 510 y ATCC 29213) productoras de exopolisacáridos (PE), las cuales fueron obtenidas a partir de cepas no productoras de exopolisacáridos (NPE; Baselga et al 1992) procedentes de casos clínicos. La cepa ATCC 29213, empleada como control, fue cedida por el Dr. C. Gómez-Lus (Facultad de Medicina Universidad de Zaragoza).

Antibióticos y Concentraciones inhibitoria (CIM) y bactericida (CBM) mínimas . Se utilizaron 14 antibióticos (los que figuran en la Tabla 1), todos ellos obtenidos de Sigma (St. Louis, EEUU) excepto la ciprofloxacina que fue cedida por la delegación de Bayer en Barcelona. CIM y CBM se determinaron por microdilución en medio líquido (Mueller-Hinton), siguiendo las recomendaciones de la National Committee of Clinical Laboratory Standards, EEUU (NCCLS). La CBM se consideró como una reducción de la viabilidad bacteriana del 99,99% respecto del inóculo inicial.

Formación de biofilms (biocapas) y aplicación de antibióticos "in vitro". Se emplearon las variantes PE para la formación de los biofilms de distintas edades (6, 24 y 48 h), utilizando como medio de crecimiento TSB, según la técnica de Amorena et al. (1995). Los antibióticos elegidos se diluyeron en Mueller-Hinton: a 4 veces la CBM (de la cepa que mostraba mayor CBM), a 100 μg/ml y a 500 μg/ml. Se cuantificaron por bioluminscencia las bacterias viables tras 24 h de exposición a los antibióticos, considerando que la luz producida por hidrólisis del ATP bacteriano podía cuantificarse con un Luminómetro (Luminoskan, Labsystems) y era proporcional al número de bacterias viables (Stanley et al., 1989).

Análisis estadístico. La comparación se hizo mediante un análisis de varianza multifactorial, considerando un antibiótico eficaz cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre el control (sin tratamiento antibiótico) y el biofilm tras el tratamiento. Los ensayos se realizaron por duplicado y en 5 ocasiones diferentes para cada caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. *CIM y CBM.* La CIM y la CBM de las variantes PE fueron semejantes a las de las variantes NPE, para bacterias en suspensión (nunca había más de una dilución de diferencia). Todas las cepas fueron sensibles a los antibióticos ensayados excepto la cepa 510, la cual resultó resistente a la Penicilina, con una CIM de 16 μg/ml.

Ensayo de antibióticos en biofilms. En la Tabla 1, se ilustran los resultados de sensibilidad a los 14 antibióticos para el conjunto de las cepas. A 4 veces la CBM de cada antibiótico, únicamente cuatro antibióticos (cefazolina, cefuroxima, rifampicina y fosfomicina) resultaron efectivos en todos los casos. Los restantes antibióticos resultaron ineficaces a esta concentración, bien para biofims de cualquiera de las edades estudiadas (véanse amikacina, estreptomicina, gentamicina, tobramicina, clindamicina y ciprofloxacina) o bien para biofilms con edades $\geq$ 24 h (véanse penicilina, eritromicina, ofloxacina y vancomicina).

En muchos casos, la eficacia aumentaba al incrementar la concentración del antibiótico y disminuía conforme avanzaba la edad del biofilm. Concretamente, al aumentar la concentración a 100 μg/ml, los antibióticos ya efectivos a 4 veces la CBM, así como la vancomicina resultaron efectivos en todos los casos. Dos antibióticos sólo resultaron eficaces en biofilms de 6 h (amikacina y eritromicina), cuatro eran eficaces en biofilms de $\leq$ 24 h (penicilina, gentamicina, ciprofloxacina y ofloxacina) y tres resultaron ineficaces frente a biofilms de cualquiera de las edades (estreptomicina, tobramicina y clindamicina). A 500 μg/ml, se observaron algunos cambios hacia una mayor eficacia respecto de lo observado a 100 μg/ml. Concretamente, la mayoría de los los antibióticos (10) resultaron eficaces. Tres antibióticos (estreptomicina, eritromicina y clindamicina) sólo resultaron eficaces en biofilms de $\leq$ 24 h y un antibiótico (tobramicina) fue el único que sólo resultó eficaz para los biofilms de 6 h. Cuando tras la formación de un biofilm de 24 h se restringió el período de contacto de los antibióticos (100 μg/ml) a 3 ó 6 h (en lugar de 24 h), aplicando el mismo criterio para el análisis estadístico, se comprobó que únicamente la fosfomicina, y la rifampicina fueron significativamente diferentes a sus controles en algunos casos (dependiendo de la cepa y la edad del biofilm), mientras que los anitibióticos amikacina, cefuroxima, cefazolina, penicilina, tobramicina y vancomicina no fueron eficaces (los restantes antibióticos no fueron sometidos a este ensayo). Estos resultados son indicativos de que algunos antibióticos pueden actuar más rápidamente que otros en igualdad de condiciones cuando las bacterias están formando biofilms.

En conjunto, estos resultados demuestran la ineficacia de muchos antibióticos para atacar a las bacterias del interior de biofilms y sugieren la gran importancia de un análisis de la

eficacia antibiótica en biofilms, bien en la práctica clínica antes de aplicar un tratamiento antibiótico a individuos con infecciones crónicas que se supone albergan biofilms, o bien en la industria farmacéutica antes de lanzar un antibiótico al mercado. Dicho análisis puede contribuir a la disminución del uso indiscriminado de antibióticos, a una menor tasa de aparición de resistencias a antibióticos y, en definitiva, a una mayor calidad productiva y sanitaria.

Tabla 1: Eficacia de 14 antibióticos frente a bacterias en biofilms de *Staphylococcus aureus* en función de la concentración aplicada y la edad del biofilm (P< 0,01 para las diferencias en viabilidad bacteriana entre un antibiótico eficaz, E, y el control sin tratamiento antibiótico).

Antibiótico	4xMBC			100 µg/ml			500 µg/ml		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
Penicilina	E	NoE	NoE	E	E	NoE	E	E	E
Cefazolina	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Cefuroxima	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Amikacina	NoE	NoE	NoE	E	NoE	NoE	E	E	E
Estreptomicina	NoE	NoE	NoE	NoE	NoE	NoE	E	E	NoE
Gentamicina	NoE	NoE	NoE	E	E	NoE	E	E	E
Tobramicina	NoE	NoE	NoE	NoE	NoE	NoE	E	NoE	NoE
Eritromicina	E	NoE	NoE	E	NoE	NoE	E	E	NoE
Clindamicina	NoE	NoE	NoE	NoE	NoE	NoE	E	E	NoE
Ciprofloxacina	NoE	NoE	NoE	E	E	NoE	E	E	E
Ofloxacina	E	NoE	NoE	E	E	NoE	E	E	E
Rifampicina	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Vancomicina	E	NoE	NoE	E	E	E	E	E	E
Fosfomicina	E	E	E	E	E	E	E	E	E

AGRADECIMIENTOS.- Agradecemos especialmente la colaboración de los ganaderos y centros responsables de los animales estudiados, así como el consejo de distintos colegas, y especialmente de los Dres. A. Laclériga, C. Seral , C. Gómez-Lus, J. Leiva para la elección de los antibióticos. Financiado por FIS (Nª 96/0230) y CONSID (N° PCM1694).

REFERENCIAS

- Amorena, B., Gracia, E. Alabart, J.L. 1995. ITEA. Vol. Extra, 16: 554-556.
- Baselga, R., Albizu, I., Penadés, J.R. 1992. Current Microbiol.. 25: 173-179
- Stanley, P.E., McCarthy, B.J., Smither, R. 1989. ATP Luminescence: rapid methods in microbiology. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.