ANTIBIOGRAMA PARA *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* EN BIOFILM

M. Monzón*, M. Pérez*, P. Leiva, C. Oteiza** y B. Amorena***

**CSIC- Unidad de Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agroalimentaria (DGA), Zaragoza.*
***Departamento de Microbiología, Clínica Universitaria de Pamplona. Pamplona, Navarra.*

INTRODUCCIÓN

Se ha utilizado la bioluminiscencia como método automatizado para cuantificar la viabilidad de las bacterias en la especie *Staphylococcus epidermidis*, cuando se encuentran adheridas formando biofilms. El método permite determinar la sensibilidad a distintos antibióticos cuando éstos son aplicados a dichos biofilms. La información así generada puede contribuir a la mejora de la elección de antimicrobianos, principalmente cuando la infección es de tipo crónico, pues en este caso el fallo terapéutico aumenta significativamente. Dicho test puede tener una aplicabilidad directa en el tratamiento de mastitis ovina, en la que la prevalencia de *S. epidermidis* y de estafilococos coagulasa negativos es elevada, según se ha observado en las razas Latxa (Marco, 1994) y Manchega (De la Cruz, 1994); así como en el tratamiento de infecciones post-quirúrgicas, frecuentes en clínica humana (Gristina et al., 1987).

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos. Se han utilizado 4 cepas distintas de *S. epidermidis* (12, 19, 60 y ATCC 12228) productoras de exopolisacáridos (PE), que fueron obtenidas en el laboratorio por selección a favor de la adherencia a partir de cepas procedentes de casos clínicos (Baselga et al., 1992). *Antibióticos*. Se probaron 9 antibióticos (Tabla 1), distribuídos por Hoechst Marion Roussel (teicoplanina), Almirall (trimetroprim-sulfametoxazol) y Sigma (los restantes). Se estudió la sensibilidad a estos antimicrobianos en el antibiograma clásico (de discos) y posteriormente se determinaron las concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) por microdilución en medio líquido (Mueller-Hinton), según las recomendaciones de la National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Las cepas que según uno de estos tests resultaron ser resistentes a algún antibiótico, fueron descartadas del estudio concreto de ese antibiótico en el test de biofilm. *Formación de los biofilms y test in vitro de antibióticos en biofilm*. Se formaron biofilms de 3 edades diferentes (6, 24 y 48 h) sobre el fondo de placas microtiter de cultivo celular y utilizando TSB enriquecido con glucosa al 2% (según la técnica de Amorena et al., 1995). Los antibióticos se diluyeron en Mueller-Hinton a las distintas concentraciones: CMB (tomando para cada antibiótico el valor de la cepa con mayor CMB) y la concentración alcanzada teóricamente en suero (pico en suero, PS; Moellering et al., 1991; Mensa, 1998). Tras 24 h de exposición de los biofilms a los antibióticos, se cuantificó el número de bacterias viables por bioluminiscencia (Gracia, 1997) utilizando un luminómetro (Luminoskan, Labsytems). *Análisis estadístico*. Las comparaciones se realizaron de forma individualizada para cada antibiótico tras el tratamiento frente a su respectivo control no tratado, y para ello se utilizó un análisis de varianza mutifactorial. Los ensayos se realizaron por triplicado y, al menos, en 4 ocasiones diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antibiogramas clásicos. Según los dos antibiogramas (discos y microdilución), sólo se encontró susceptibilidad por parte de las 4 cepas para tres antibióticos, frente a los nueve probados (para los otros 6 antibióticos se encontró sensibilidad en, al menos, 2 cepas). Estos resultados confirman el alto nivel de acumulación de resistencias en *S. epidermidis*. Por otra parte, también se observó que alguna cepa que aparecía como sensible en el antibiograma clásico de discos, se comportó como resistente por microdilución. Esta información pone de manifiesto la posibilidad de encontrar una falsa susceptibilidad en el test de discos (test utilizado de forma cotidiana en la práctica clínica), aumentando el posterior fracaso terapéutico.

Test de antibióticos en biofilm. La Tabla 1 refleja los resultados obtenidos sobre la sensibilidad a los antibióticos en biofilms en el conjunto de las cepas seleccionadas para cada antibiótico. En todos los casos, se observa una clara disminución de la eficacia del antibiótico a medida que la edad del biofilm aumenta; esta observación está probablemente relacionada con la mayor dificultad para combatir infecciones crónicas, asociadas a la presencia de biofilms de edad elevada. También se observa un aumento de la efectividad al aumentar la concentración del antimicrobiano.

Si nos centramos en los resultados obtenidos con la concentración alcanzada en suero (PS), que no debería sobrepasarse en la práctica clínica, podemos obsevar que tan sólo la rifampicina y la tetraciclina son eficaces frente a los biofilms de todas las edades probadas; la rifampicina parece tener un efecto similar tanto en biofilms jóvenes como en biofilms más viejos; por otro lado, la tetraciclina, a pesar de presentar una mayor eficacia que la rifampicina frente a los biofilms de 6 h, disminuye su efectividad a medida que aumenta la edad del biofilm, llegando a alcanzar valores menores que en el caso de la rifampicina. Ambos antibióticos, efectivos a esta concentración (PS), se estudiaron también a otras concentraciones (5 y 1 mg/L en el caso de la rifampicina, y CMI en el caso de la tetraciclina), descendiendo la efectividad de estos antimicrobianos (como cabía esperar), hasta anularse frente a biofilms de 6 h a la concentración de 1 mg/L (para la rifampicina) o a la CMI (para la tetraciclina).

Merece resaltarse que la vancomicina resultó muy eficaz frente a biofilms jóvenes, llegando a alcanzar la máxima efectividad entre todos los antibióticos probados, pero no fue capaz de disminuir ni siquiera ligeramente la viabilidad bacteriana en biofilms de 24 horas, y menos aún de 48 h.

Algunos antibióticos (ofloxacina, trimetroprim-sulfametoxazol y rifampicina) aplicados a la CMB, concentración bactericida para bacterias en suspensión, ni siquiera fueron capaces de reducir ligeramente la viabilidad bacteriana en los biofilms de menor edad (6h).

Queda demostrada con los datos expuestos la importancia de un antibiograma para bacterias en biofilms, ya que en éstos aumenta claramente la resistencia a los antimicrobianos. Este tipo de antibiogramas podría ser aplicado en la prática clínica para elegir el tratamiento más adecuado frente a bacterias formadoras de biofilms, o en la industria farmacéutica con el objeto de demostrar la eficacia de un nuevo antibiótico frente a biofilms, de cara al lanzamiento de un nuevo producto al mercado. Por otra parte, podría reducirse con esta información la creciente aparición de las resistencias a antimicrobianos debida al uso indiscriminado de antibióticos y a los falsos resultados de sensibilidad obtenidos en muchas ocasiones al utilizar los antibiogramas clásicos.

Tabla 1.- Sensibilidad de *Staphyloccus epidermidis* en biofilm frente a 9 antibióticos aplicando 2 concentraciones de antimicrobiano y 3 edades de biofilm (los valores que aparecen son las diferencias entre la viabilidad bacteriana tras el tratamiento antibiótico y la del control sin tratar, expresadas en log_{10} cfu/ml).

Antibiótico	PS[1]				CMB[2]			
	Valor	Edad del biofilm			Valor	Edad del biofilm		
		6h	24h	48h		6h	24h	48h
Cefalotina	70	-.754*	-.191*	-.005	4	-.395*	-.026	.052
Clindamicina	12	-.311*	-.085	.063	16	-.45*	-.134*	-.003
Eritromicina	8	-.373*	-.213*	.043	32	-.607*	-.297*	-.214*
Ofloxacina	8.5	-.008	-.049	.012	2	.003	-.028	.045
Rifampicina	10	-.642*	-.635*	-.566*	0.5	.091	.032	.102
Teicoplanina	50	-.572*	-.119*	.085	8	-.025	.006	.067
Tetraciclina	16	-.908*	-.589*	-.419*	32	-.971*	-.634*	-.382*
Trm/sfm	3.4/46	.096	.029	.203	12.8/64	.062	-.028	.151
Vancomicina	40	-.965*	-.071	-.012	8	-.343*	-.032	.038

[1] Concentración teóricamente alcanzada en sangre (Moellering et al., 1991; Mensa, 1998).
[2] Concentración mínima bactericida, tomando para cada antibiótico el valor de la cepa con mayor CMB.

AGRADECIMIENTOS. Financiado por CONSID 1694, FIS 2300 y Fundación Echebano 337/97.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amorena B, Gracia E, Alabart JL, Conchello P. 1995. Formación de biofilms de *Staphylococcus aureus* en placas de plástico de 96 pocillos y cuantificación de la viabilidad bacteriana mediante ATP-bioluminiscencia. ITEA. Vol Extra 16 (II):554-556.
2. Baselga R, Albizu I, Aguilar B, Iturralde M, Amorena B. 1992. Hydrophobicity of ruminant mastitis *S. aureus* in relation to bacterial aging and slime production. Current Microbiol 25:1,62-70.
3. De la Cruz M, Serrano E, Montoro V, Marco J, Romeo M, Baselga R, Albizu I, Amorena B. 1994. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-late lactation. Small Ruminant Research 14:175-180.
4. Gracia E. 1997. Test de sensibilidad a antibióticos para *S. aureus* formadores de biofilms.Tesis doctoral en la Universidad de Zaragoza.
5. Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. 1987. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. Biomaterials 8:423-426.
6. Marco, JC. Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control. 1994. Tesis doctoral en la Universidad de Zaragoza.
7. Mensa J. 1998. Guía terapéutica antimicrobiana. Masson. 8ª Edición.
8. Moellering RC, Yao JDC, Thornsberry C. 1991. Approximate concentrations of antimicrobial agents achieved in blood. Appendix 2: p1201-1202. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. ASM. Washington.