

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Bacteriemia relacionada con el catéter y neumonía asociada
a ventilación mecánica: nuevas estrategias de erradicación
del biofilm**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Beatriz Alonso Fernández

DIRECTORA

María Guembe Ramírez

Madrid

Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



**Bacteriemia Relacionada con el
Catéter y Neumonía Asociada a
Ventilación Mecánica: nuevas
estrategias de erradicación del
biofilm**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Beatriz Alonso Fernández

Director:

Dra. María Guembe Ramírez

*A mis padres, mi tío, mi abuela
y mis hermanos.*

AGRADECIMIENTOS

Tras tres años de duro trabajo, me gustaría que estas líneas sirvan de agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que haya llegado a la meta.

Me gustaría comenzar agradeciendo todo el apoyo obtenido por parte del Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. En especial, a mi directora la Dra. María Guembe que ha sido el pilar de esta tesis doctoral y sin la cual yo no habría llegado hasta este punto. A Raquel Cruces, mi malagueña favorita, la mejor compañera que se puede tener de la que he aprendido no solo en el ámbito científico, sino que también me ha hecho crecer a nivel personal, en ella he encontrado un pilar de apoyo tanto laboral como personalmente. A María Consuelo Latorre por todos esos momentos de desahogo que ha compartido conmigo. A la Dra. Belén Rodríguez simplemente por “estar ahí”, por todas las conversaciones y risas compartidas. A la Dra. Raffaella Onnori por esas experiencias inolvidables en los congresos europeos. Al Dr. Jesús Guinea, a la Dra. Pilar Escribano, a la Dra. Laura Marcos-Zambrano, a María Ángeles Bordallo Cardona y a Judith Díaz García por toda la paciencia, ayuda y comprensión que recibí durante mi estancia en la Universidad Complutense de Madrid. Por supuesto, no quiero olvidarme de la Dra. Mercedes Marín, la Dra. Adoración Martín López, Cristina Iglesias Arribas y Maribel Zamora Cintas por toda la ayuda recibida durante la realización de los ensayos de biología molecular, pero, sobre todo, me gustaría darles las gracias por haber creado un gran box de diagnóstico molecular donde realizan un excepcional trabajo, por haber conseguido incrementar mi interés en las herramientas moleculares de diagnóstico y por supuesto por ser personas excepcionales. Cabe destacar lo agradecida que estoy a la profesora y Dra. Patricia Muñoz por haber permitido que realizara este trabajo en su servicio, financiando parte de la investigación y motivándome para continuar.

“Hija, la tesis es como una maratón, siendo constante y con esfuerzo lo conseguirás”, Dr. Manuel Alonso Morón. “Cariño, tu primero acaba y luego ya veremos”, María Isabel Fernández Rodríguez. A mis padres por su completo apoyo y dedicación a

mi durante toda una vida. Por todo lo que he aprendido de ellos y por todo lo que me han dado. Gracias a vosotros soy quien soy y he llegado a donde estoy y no tengo palabras para agradecerlos hasta donde me habéis traído.

“Ratita, vales mucho y no dejes de luchar por lo que quieres, aquí estamos para apoyarte en todo”, Jesús Fernández. “Muñequita, eres lo más precioso de este mundo y como me alegra que estés aquí”, Petra Rodríguez Hernando. A mi tío y a mi abuela por su amor y apoyo incondicional. Por recibirme siempre con los brazos abiertos y por ayudar a levantarme cada vez que me caigo.

“Mono, monkeyface, marimonkey”, Jorge Alonso Fernández. “El mono empollón ha llegado”, Elena Jiménez Alcalá. A mis hermanos por recordarme cada día que con ilusión y esfuerzo se puede conseguir cualquier cosa. Por ser adultos, pero seguir alimentando al niño que llevan dentro y enseñarme que por muy duro que sea siempre hay unos “gatitos” que te acompañan durante todo el camino.

“A partir de ahora te llamaré doctora bacterio, ¿vale Mo?, aunque los bioquímicos solo pintéis celulitas”, Mario García Agudo. A mi marido. Por estos 14 años recordándome que los polos opuestos se atraen encajando a la perfección como dos piezas de un puzle. Por ser mi apoyo y mi fuerza a diario.

“Chu, no sabes cuánto te quiero. Nos deberíamos hacer un viaje de doctoras”, Dra. María Velasco-Estévez. “Jo gordi cuánto te echo de menos”, Beatriz Vara Márquez. “Nunca dejes de ser como eres. Puedes conseguir todo lo que te propongas”, Víctor Capilla Ruiz. A tres de las personas más importantes de mi vida que no me han dejado rendirme nunca durante todo este proyecto. Por tenderme una mano sin ni siquiera pedirla. Por confiar en mí y sobre todo por valorarme como lo hacen.

A toda mi familia de bioquímicos, a mis amigas de Las Navas del Marqués, a mis amigos de Brighton, a Ignacio Callejas y Marta Martínez y a mi familia política sobre todo a M^a Teresa Agudo Agudo y a Julián García Rubio.

Gracias de todo corazón porque, de una forma o de otra, gracias a vosotros he conseguido llegar hasta aquí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	13
1. Bacteriemia relacionada con el catéter.	15
1.1. Definiciones y Epidemiología.....	15
1.2. Patogenia y etiología.....	18
1.2.1. Patogenia.....	18
1.2.2. Etiología.....	19
1.3. Diagnóstico de la BRC.	20
1.3.1. Técnicas sin retirada de la vía.....	21
1.3.2. Técnicas diagnósticas con retirada del catéter.	23
1.4. Prevención y tratamiento de la BRC.....	25
1.4.1. Prevención.....	25
1.4.2. Tratamiento.....	28
2. Neumonía asociada a ventilación mecánica.	31
2.1. Epidemiología, patogenia y etiología.....	31
2.1.1. Epidemiología.....	31
2.1.2. Patogenia.....	32

2.1.3.	Etiología.....	34
2.2.	Diagnóstico de la NAVM.	35
2.2.1.	Diagnóstico clínico.....	35
2.2.2.	Diagnóstico microbiológico.	36
2.3	Prevención y tratamiento de la NAVM.....	37
2.3.1.	Prevención.....	37
2.3.2.	Tratamiento.....	38
3.	Biofilm.....	40
3.1.	Aspectos generales.	40
3.2.	Fases de la formación del biofilm.	41
3.2.1.	Transporte de los microorganismos a la superficie y adhesión inicial.....	41
3.2.2.	Formación de microcolonias.	42
3.2.3.	Maduración del biofilm.	43
3.2.4.	Dispersión.....	43
3.3.	Componentes del biofilm.....	44
3.4.	Implicación del biofilm en el proceso de infección, evasión de la respuesta inmune y resistencia a antibióticos.	45
3.5.	Métodos diagnósticos de las infecciones relacionadas con el biofilm en el laboratorio de Microbiología Clínica.	48
3.6.	Estrategias de tratamiento y prevención del biofilm.	51
3.6.1.	Modificaciones de las superficies de los biomateriales y uso de agentes anti-adhesivos.	52

3.6.2. Terapias basadas en fagos, uso de nanopartículas e inhibición del sistema de “quorum sensing” .	53
3.6.3. Agentes activadores de la cascada de señalización de c-di-GMP .	56
JUSTIFICACION E HIPÓTESIS	59
OBJETIVOS	65
Hipótesis 1	67
OBJETIVO 1	67
Hipótesis 2	68
OBJETIVO 2	68
Hipótesis 3	69
OBJETIVO 3	69
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. Descripción del hospital.	73
2. Aislados clínicos estudiados.	73
2.1. Cepas ATCC.	73
2.2. Cepas de origen en el catéter.	74
2.3. Cepas de <i>P. aeruginosa</i> de origen respiratorio causantes de NAVM y de otros orígenes.	74
2.4. Cepas provenientes de otros hospitales.	74
3. Formación de biopelículas en placa multi-pocillo.	75

3.1. Revelado de las placas para la cuantificación de la producción de biomasa mediante tinción por cristal violeta.....	76
3.2. Revelado de las placas para la cuantificación de la actividad metabólica mediante el uso de sales de tetrazolio (XTT).....	76
3.3. Clasificación de las cepas en función de su capacidad de formar biofilm por CV o XTT..	77
4. Sellado con etanol <i>in vitro</i> y capacidad de recrecimiento.....	77
4.1. Tratamiento con etanol.	77
4.1.1. Tratamiento de etanol y heparina frente a cepas ATCC.	77
4.1.2. Tratamiento de etanol con enoxaparina en cepas ATCC.	78
4.1.3. Tratamiento con etanol y heparina en cepas clínicas.	78
4.1.4. Cálculo de la reducción de la biomasa y de la actividad metabólica tras el tratamiento.	79
4.2. Capacidad de recrecimiento.	79
4.3. Análisis estadístico.	80
5. Actividad de la heparina.	81
6. Profilaxis y tratamiento de NAVM sobre modelo <i>in vitro</i>.	83
6.1. Modelo <i>in vitro</i> de NAVM.	83
6.2. Terapia de profilaxis.....	83
6.3. Terapia de tratamiento.....	84
6.3.1. Formación del biofilm sobre TET.....	84
6.3.2. “Terapia de sellado”.	84
6.4. Procesamiento de los tubos.	85

6.4.1.	Recuento de unidades formadores de colonias y porcentaje de células vivas.....	86
6.4.2.	Visualización de la biomasa de la biopelícula.....	87
6.4.3.	Visualización de la estructura de la biopelícula.	87
6.5.	Test de filtración.	87
6.6.	Análisis estadístico.	88
7.	Caracterización feno-genotípica de cepas de <i>P. aeruginosa</i>.	88
7.1.	Determinar el grado de producción de biofilm en modelo estático de placas multi-pocillo por cristal violeta y XTT, el aspecto mucoso de las colonias y la producción de pioverdina o piocianina.	88
7.2.	Caracterización molecular por PCR de los genes <i>Apr</i> , <i>plcH</i> , <i>LasB</i> , <i>LasI</i> , <i>LasR</i> , <i>rhII</i> , <i>rhIR</i> , <i>ExoS</i> , <i>ExoU</i> , <i>ExoT</i> , <i>ExoY</i> , <i>AlgD</i> , <i>plcN</i> y <i>AlgU</i>	90
7.2.1.	Extracción de ADN bacteriano.....	90
7.2.2.	Presencia o ausencia de genes de virulencia.	90
7.3.	Determinación del grado de patogenicidad en modelo <i>in vivo</i> de <i>Galleria mellonella</i>	94
7.4.	Análisis estadístico.....	96
	RESULTADOS	99
1.	El etanol, tanto solo como combinado con anticoagulante como solución de sellado, es capaz de disminuir el biofilm, tanto bacteriano como fúngico, causante de BRC.	101

1.1. Optimización de la concentración y tiempo de tratamiento de etanol y heparina en cepas ATCC. Reducción de la actividad metabólica del biofilm tras la terapia de sellado con etanol y heparina.	101
1.2. Inhibición del recrecimiento de las cepas tratadas con la solución de sellado de etanol y heparina.	105
1.3. Actividad de la heparina combinada con diferentes concentraciones de etanol.	108
1.4. Optimización de la concentración y del tiempo de tratamiento del etanol y la enoxaparina en cepas ATCC.	109
1.5. Capacidad del etanol combinado con heparina para erradicar el biofilm de cepas clínicas causantes de BRC en un modelo <i>in vitro</i>	112
2. La SDD usada como terapia de cierre en el TET previene y erradica el biofilm en un modelo <i>in vitro</i> de NAVM.	118
2.1. Terapia de profilaxis.	118
2.2. Terapia de tratamiento.	122
2.3. Test de filtración.	125
3. Las cepas de <i>P. aeruginosa</i> procedentes de pacientes con NAVM presentan diferencias en su virulencia <i>in vivo</i> pero no fenotípicamente respecto a cepas provenientes de otros lugares de infección.	127
3.1. Formación de biofilm.	127
3.2. Aspecto mucoso de las colonias y producción de pigmentos.	128
3.3. Presencia de genes de virulencia.	129
3.4. Ensayos de virulencia en modelo <i>in vivo</i> de <i>G. mellonella</i>	131

DISCUSIÓN	133
1. Diseño y validez en estudio <i>in vitro</i> de una solución de sellado de catéter idónea para erradicar el biofilm de diversas bacterias y levaduras con mínima concentración de etanol y de anticoagulante capaz de evitar la inactivación de la capacidad anti-trombótica del anticoagulante.....	137
2. Estudio de la eficacia de la solución digestiva descontaminante como “terapia de sellado” en el espacio subglótico del tubo endotraqueal, comparando la viabilidad de diversas bacterias y la composición de su biofilm mediante tres técnicas diagnósticas <i>in vitro</i>	145
3. Caracterización de virulencia de cepas de <i>P. aeruginosa</i> causantes de neumonía asociada a ventilación mecánica.	149
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXOS	193

ABREVIATURAS

Abs:	Absorbancia.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ADNe:	Ácido desoxirribonucleico extracelular.
AHL:	Acilhomoserina lactona.
AIP:	Atoinductor peptídico.
ARN:	Ácido ribonucleico.
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosómico.
ATCC:	American Type Cell Culture.
BF:	Biofilm.
BHI:	Brain Heart Infusion (infusión de cerebro y corazón).
BLEE:	Beta-lactamasa de espectro extendido.
BRC:	Bacteriemia relacionada con el catéter.
c-di-GMP:	3',5'-diguanylate cíclico.
cm:	Centímetro.
Cols:	Colaboradores.
CV:	Cristal violeta.

CVC:	Catéter venoso central.
CVNC (VBNC):	Células viables no cultivables.
DE:	Desviación estándar.
DO:	Densidad óptica.
DOc:	Densidad óptica del control.
ECN:	Estafilococo coagulasa negativo.
ECN-RM:	Estafilococo coagulasa negativo resistente a meticilina.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
ENOX:	Enoxaparina.
ERV:	Enterococo resistente a vancomicina.
EPS:	Exopolisacárido.
ESCMID:	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
ET:	Etanol.
FDA:	Food and drug administration (administración de alimentos y medicamentos).
FQ:	Fibrosis quística.
Hz:	Herzios.
IR:	Inhibición del recrecimiento.
LB:	Caldo de Luria Bertani.

MALDI-TOF:	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight.
ME:	Matriz extracelular.
ml:	Militro.
μl:	Microlitro.
mM:	Milimolar.
mm:	Milímetro.
mm Hg:	Milímetros de mercurio.
multi-R:	Multirresistente.
NAVM:	Neumonía asociada a ventilación mecánica.
nm:	Nanómetros.
NPT:	Nutrición parenteral.
PBS:	Solución de tampón fosfato.
PCR:	Polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).
p.e.:	Por ejemplo.
p/p:	Peso/peso.
QS:	Quorum sensing.
Rpm:	Revoluciones por minuto.
RPMI 1640:	Roswell Park Memorial Institute 1640.
SARM:	Staphylococcus aureus resistente a meticilina.

SASM:	Staphylococcus aureus sensible a meticilina.
SDD:	Solución digestiva descontaminante.
SDRA:	Síndrome de distrés respiratorio del adulto.
TET:	Tubo endotraqueal.
TRI:	Tracto respiratorio inferior.
TSB:	Tryptic Soy Broth (caldo de digerido de soja y caseína).
UCI:	Unidad de cuidados intensivos.
Ufc:	Unidades formadoras de colonia.
VPN:	Valor predictivo negativo.
VPP:	Valor predictivo positivo.
XDR:	Extremadamente resistente.
XTT:	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida.
YPD:	Yeast peptone dextrose.

RESUMEN

La bacteriemia relacionada con el catéter (BRC) y la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) son dos de las infecciones nosocomiales más importantes con alta morbi-mortalidad, altos costes asociados y prolongadas estancias hospitalarias. Ambas entidades se caracterizan por la formación de biopelículas bacterianas o fúngicas sobre la superficie de los catéteres intravasculares o de los tubos endotraqueales, respectivamente. Los biofilms confieren resistencia intrínseca a los microorganismos embebidos en estas estructuras dificultando el diagnóstico y el tratamiento de este tipo de infecciones. Por ello los principales objetivos de esta tesis son el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para erradicar el biofilm en la BRC y en la NAVM, así como esclarecer la patogénesis de ésta última en busca de nuevos biomarcadores de diagnóstico.

En un modelo *in vitro* de placa multi-pocillo, hemos demostrado que una solución compuesta por etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina, sin ser inactivada, aplicada como solución de sellado durante 72 horas, es capaz de reducir la actividad metabólica del biofilm de 5 de los principales agentes causales de la BRC tanto en cepas ATCC como en cepas clínicas. Sin embargo, estos microorganismos son capaces de recrecer tras días de la finalización de la terapia poniendo de manifiesto la presencia de un fenómeno denominado “células viables pero no cultivables” (CVNC).

En relación con la NAVM, este estudio demuestra cómo la solución digestiva descontaminante aplicada sobre el espacio subglótico en un modelo *in vitro* de

intubación, es capaz de prevenir y eliminar el biofilm de 3 de los microorganismos más comúnmente causantes de la NAVM. Asimismo, también se observaron CVNC lo que pone de manifiesto la importancia de estas células en el diagnóstico y tratamiento de la NAVM.

Finalmente, usando cepas clínicas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM aisladas en diferentes hospitales de España y de Italia, evaluamos las características de virulencia de estas cepas tanto fenotípica como genotípicamente y en un modelo *in vivo* de *G. mellonella*. Este estudio demuestra como la alta formación de biofilm está implicada en multitud de infecciones. Asimismo, demuestra que las cepas de NAVM poseen los mismos genes de virulencia que las cepas aisladas en otros orígenes de infección, pero son menos virulentas en el modelo *in vivo*.

En resumen, este trabajo propone dos mecanismos novedosos para el tratamiento y prevención de dos de las infecciones nosocomiales más importantes. Asimismo, esclarece puntos clave no descritos en la literatura de la patogénesis de *P. aeruginosa* en la NAVM, abriendo nuevas líneas de estudio en el ámbito del diagnóstico de esta entidad.

ABSTRACT

Catheter-related bloodstream infection (C-RBSI) and ventilator-associated pneumonia (VAP) are two of the most important nosocomial infections related with high morbi-mortality, high associated costs and prolonged hospital stays. Both diseases are characterized by the formation of bacteria and fungal biofilms on to catheter and endotracheal tube surfaces. Biofilms confer intrinsic antimicrobial resistance to those microorganisms embedded in these structures, making these infections difficult to diagnose and to treat. Hence the aims of this study are the development of new therapeutic approaches to eradicate the biofilms implicated in C-RBSI and VAP and, to elucidate the pathogenesis of VAP caused by *P. aeruginosa* to find new diagnostic biomarkers.

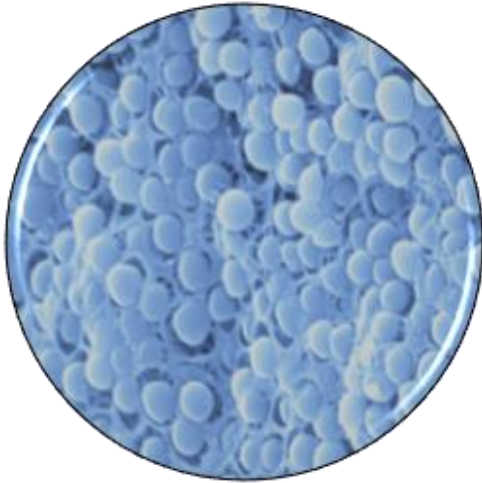
In an *in vitro* model of microtiter plates, we demonstrated that a solution composed by 40% ethanol combined with 60 IU of heparin without being inactivated, used as lock therapy for 72 hours, can decrease the metabolic activity of 5 of the most causative agents of C-RBSI, both in ATCC and clinical strains. However, these microorganisms were able to regrowth within 3 days after the therapy, showing the presence of “viable but not culturable” cells (VBNC).

Related with VAP, we demonstrated in an *in vitro* model of intubation, that the application of the selective digestive decontamination solution into the subglottic space, was able to prevent and eradicate the biofilm of three of the most common

microorganisms causing VAP. Moreover, we also observed the presence of VBNC cells which hinders the diagnose and treatment of VAP.

Finally, we used clinical isolates collected from patients with VAP from different hospitals of Spain and Italy, to evaluate the virulence characteristics both *in vitro* and *in vivo*. The study showed that high-biofilm forming strains were implicated in many kinds of infections. Moreover, we demonstrated that VAP strains had the same distribution of virulence genes as non-VAP strains, being less virulent *in vivo*.

In conclusion, we propose two newly mechanisms for the prevention and treatment of two of the most important nosocomial infections. Furthermore, we described some key points in the virulence and pathogenesis of *P. aeruginosa*, which have not been previously described in the development of VAP, opening new lines of study for the diagnosis and treatment of VAP.



INTRODUCCIÓN

1. Bacteriemia relacionada con el catéter.

1.1. Definiciones y Epidemiología.

Un catéter venoso central es un dispositivo que se inserta en una vena y se usa para la administración parenteral de nutrientes, sangre, fluidos o medicación; para la obtención de muestras de sangre; y para hemodiálisis o monitorización hemodinámica (1, 2). A lo largo del tiempo, diferentes tipos de CVCs (**tabla 1**) se han usado para mejorar el cuidado del paciente (1). Sin embargo, la presencia de estos catéteres se asocia con un alto riesgo de colonización y subsecuente infección del dispositivo (1, 3).

La bacteriemia relacionada con el catéter, por lo general, se define como bacteriemia originada por un catéter intravenoso siendo una de de las infecciones nosocomiales más frecuentes con altas tasas de morbimortalidad (12-25%), altos costes añadidos (18.000 euros por cada episodio) y estancias hospitalarias prolongadas (2-5). Además, a esta entidad se asocian multitud de términos que es necesario clarificar para la completa comprensión de esta infección (6, 7):

- **Colonización del catéter:** crecimiento significativo de uno o varios microorganismos en cultivo cuantitativo o semicuantitativo de la punta del catéter, de un segmento subcutáneo o de una conexión.
- **Flebitis:** endurecimiento o eritema con calor y dolor en el trayecto de una vena cateterizada actual o recientemente.
- **Infección del punto de entrada, definición microbiológica:** crecimiento significativo de al menos un microorganismo en los cultivos del exudado del punto de entrada, con o sin bacteriemia concomitante.

- **Infección del punto de entrada, definición clínica:** eritema con calor y dolor en el punto de entrada o en una zona separada hasta 2 centímetros, con o sin bacteriemia concomitante, pero asociada a otros síntomas de infección, como fiebre o exudado purulento.
- **Infección del trayecto tunelizado:** eritema con calor y dolor en una zona más allá de 2 centímetros desde el punto de entrada con o sin bacteriemia concomitante.
- **Infección del bolsillo:** infección del fluido del bolsillo subcutáneo que aloja el reservorio, frecuentemente asociado con dolor, endurecimiento o eritema en la zona, rotura espontánea con drenado, o necrosis cutánea local, con o sin bacteriemia concomitante.
- **Bacteriemia o fungemia asociada al líquido de infusión:** aislamiento del mismo microorganismo en el líquido de infusión y en el hemocultivo extraído percutáneamente, sin otro foco identificable de infección.
- **Bacteriemia o fungemia relacionada con catéter:** presencia de al menos un hemocultivo positivo obtenido por vía periférica, en un paciente con un catéter intravenoso con signos clínicos de infección (fiebre, escalofríos o hipotensión) sin otro foco identificable de infección distinto del catéter y que cumpla además al menos uno de los siguiente criterios: aislamiento significativo del mismo microorganismo en el cultivo cuantitativo o semicuantitativo de la punta del catéter, hemocultivos cuantitativos positivos obtenidos simultáneamente por el catéter y por una vena periférica y con una relación de ufc/ml de al menos 3:1 a favor del primero y/o diferencia del tiempo de positividad de hemocultivos de al menos 2 horas en sistemas automáticos obtenidos simultáneamente por el

catéter y por una vena periférica, con un volumen de sangre equivalente, y siendo el hemocultivo obtenido por el catéter el más rápido en positivar.

Aunque la verdadera incidencia de BRC no es bien conocida y varían dependiendo del tipo de catéter y del paciente, se estima que se producen desde 1 episodio (en unidades coronarias, cardiorrespiratorias, médicas, médico-quirúrgicas...) hasta 4 episodios (en unidades de quemados) por cada 1.000 días de uso del catéter (2).

Tabla 1. Tipos de CVCs y sus características (2).

Tipo de catéter	Características
CVC de inserción periférica	<ul style="list-style-type: none"> - Insertado a través de las venas del antebrazo hasta la vena cava. - Presenta menos complicaciones que los CVC normales.
CVC no tunelizado	<ul style="list-style-type: none"> - Es el más usado para tratamientos temporales. - Puede tener una o varias luces. - Ocasiona el 90% de las BRC.
CVC tunelizado	<ul style="list-style-type: none"> - Se inserta en las venas centrales a través de un túnel subcutáneo. - Puede tener más de una luz. - Se usa para terapias prolongadas. - Bajo riesgo de infecciones.
CVC con reservorio implantable	<ul style="list-style-type: none"> - Reservorio totalmente implantable subcutáneo añadido a un CVC y al que se accede mediante una membrana desde el exterior. - Las complicaciones infecciosas son menos frecuentes.

Entre los principales factores de riesgo que predisponen al desarrollo de una BRC destacan la enfermedad base del paciente, el método de inserción del catéter (de forma percutánea o mediante procedimiento quirúrgico), el sitio de inserción del catéter, el

tiempo de permanencia del catéter, el material del que esté fabricado, y la administración o no de nutrición parenteral (2, 3).

1.2. Patogenia y etiología.

1.2.1. Patogenia.

Los microorganismos causantes de BRC pueden llegar a colonizar e infectar el catéter por vía extraluminal o intraluminal mediante cuatro rutas diferentes (2-4) (**figura 1**). Justo después de la inserción, la superficie del catéter se recubre de proteínas plasmáticas, particularmente de fibrina, creando un refugio para los microorganismos (1). La contaminación microbiana puede provenir de la microbiota de la piel, de la conexión del catéter, por vía hematógena desde otro lugar de infección y, aunque poco frecuente, por líquidos de infusión contaminados (1, 8, 9). La contaminación extraluminal proviene de los microorganismos presentes en la piel y suele aparecer durante los 7-10 primeros días después de la inserción y por tanto, se relaciona con catéteres de corta duración (3). Por otra parte, la contaminación intraluminal suele provenir de las conexiones de los catéteres y se relaciona con catéteres de larga duración a partir del 7-10 día de uso (9). Independientemente de la vía de colonización, los microorganismos se adhieren rápidamente al catéter, proliferan y se agregan dando lugar al biofilm (4).

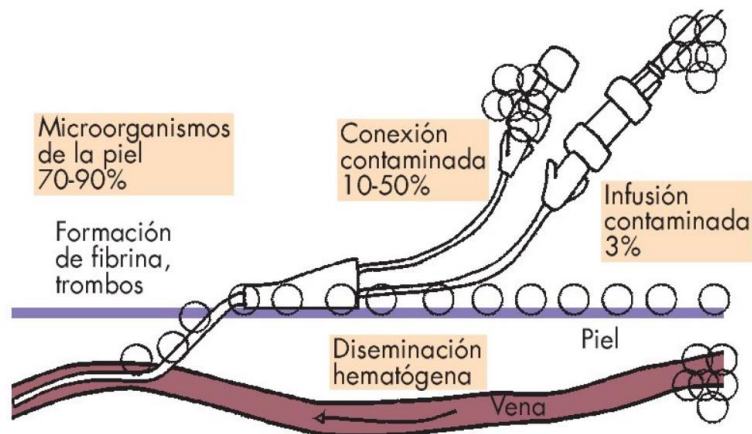


Figura 1. Pato-fisiología de la bacteriemia relacionada con el catéter: vías de colonización. Imagen obtenida de Solana, MJ “Infecciones nosocomiales (I). Infección de catéter” (2010) (10).

1.2.2. Etiología.

Los principales microorganismos responsables de las infecciones relacionadas con el catéter son cocos gram-positivos, destacando los estafilococos coagulasa negativos y *Staphylococcus aureus*, seguidos de los enterococos, los bacilos gram-negativos y las levaduras (**tabla 2**) (11, 12). Sin embargo, esta distribución varía dependiendo de la zona de inserción del catéter y del tipo de catéter. De este modo, los catéteres insertados en venas femorales son más propensos a colonizarse por bacilos-gram negativos pertenecientes a la microbiota entérica mientras que los insertados en otros lugares se suelen colonizar por cocos gram-positivos de la microbiota normal de la piel (2).

TABLA 2. Porcentajes de incidencia de los microorganismos causantes de BRC en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid (desde 2003 a 2010) (6, 13).

Microorganismo	Nº (incidencia por 1000 ingresos)
Gram +	831 (1,73)
ECN	534 (1,11)
<i>Staphylococcus aureus</i>	213 (0,44)
SASM	102 (0,21)
SARM	111 (0,23)
<i>Enterococcus</i> spp.	79 (0,16)
Otros	16 (0,03)
Gram -	209 (0,44)
<i>Escherichia coli</i>	29 (0,06)
<i>Klebsiella</i> spp.	40 (0,08)
<i>Enterobacter</i> spp.	39 (0,08)
<i>Serratia</i> spp.	25 (0,05)
<i>Proteus</i> spp.	13 (0,03)
<i>Pseudomonas</i> spp.	35 (0,07)
Levaduras	194 (0,40)
<i>Candida</i> spp.	190 (0,40)
<i>C. albicans</i>	83 (0,17)
<i>C. parapsilosis</i>	80 (0,17)
<i>C. glabrata</i>	13 (0,03)
<i>C. tropicalis</i>	9 (0,02)

ECN, Estafilococo coagulasa negativo; **SASM**, *S. aureus* sensible a la meticilina; **SARM**, *S. aureus* resistente a la meticilina.

1.3. Diagnóstico de la BRC.

El diagnóstico de la BRC y su asociación con el biofilm puede ser bastante complicado y se basa tanto en la clínica del paciente (fiebre, hipotensión, mareos, náuseas, alteraciones a nivel mental, etc..) como en hallazgos microbiológicos del laboratorio (1, 2, 14).

Cuando clínicamente se sospecha un episodio de BRC, es necesaria la confirmación microbiológica por parte del laboratorio. Para ello, existen diferentes técnicas de

diagnóstico de la BRC, aquellas que se realizan sin la retirada de la vía y aquellas que se llevan a cabo una vez el catéter ha sido retirado (6).

1.3.1. Técnicas sin retirada de la vía.

Estas técnicas permiten anticipar la colonización de la punta del catéter e identificar aquellos pacientes que tengan riesgo de desarrollar una BRC pudiendo descartar el catéter como causante de la BRC y evitando la retirada innecesaria del catéter (6). Aunque en este caso existen hasta cuatro técnicas diferentes de diagnóstico, sólo dos de ellas se usan de rutina en el laboratorio de Microbiología clínica: cultivos superficiales semicuantitativos y hemocultivos diferenciales basados en el tiempo de positividad. El resto de técnicas como el cultivo y tinciones de sangre aspirada por el catéter y las técnicas moleculares, son técnicas laboriosas y relativamente caras, y todavía no han presentado datos de rendimiento lo suficientemente altos como para considerarse técnicas de referencia y rutina (6).

❖ Cultivos superficiales semicuantitativos.

Esta técnica se basa en la detección de microorganismos en recuento significativo (≥ 15 ufc/placa) en cualquiera de las principales vías de acceso a la punta del catéter: piel circundante al punto de entrada de la vía o las conexiones del propio catéter (6). Para ello, se frota con una torunda de algodón la piel que rodea la entrada del catéter en un área de aproximadamente 1-2 cm de radio y con torundas de alginato de menor tamaño se toman muestras internas de las conexiones (6, 15). Ambas torundas se deben cultivar rápidamente en placas de agar sangre para recuento semicuantitativo considerándose como positivo un recuento de una misma especie de ≥ 15 ufc. Esta técnica ha mostrado unos porcentajes de sensibilidad y especificidad de 97% y 68% respectivamente, así

como un alto valor predictivo negativo (VPN) de 99% (16). Actualmente, se ha demostrado que el cultivo de los conectores que cierran las luces de los catéteres posee una sensibilidad para el VPN mayor que los cultivos de las conexiones internas evitando la manipulación del catéter (17). Todos estos cultivos superficiales, por su sencillez y bajos costes, se recomiendan como un método de aproximación al diagnóstico conservador de la infección de la punta del catéter (6).

❖ Hemocultivos diferenciales de tiempo.

La sangre debe ser obtenida simultáneamente de todas las luces del catéter y de una vía periférica (2, 14, 18). Es necesario que las muestras se tomen de todas las luces del catéter, ya que se ha demostrado que se pueden llegar a perder cerca del 40% de las BRC (6, 19). En este caso, se considera BRC cuando la sangre obtenida del catéter positiviza ≤ 2 horas antes que la sangre venosa periférica debido a la mayor carga microbiana en el catéter que en la sangre, aunque, cabe recalcar que este tiempo de positividad no se aplica a levaduras, donde el tiempo de positividad entre la sangre obtenida del catéter y la sangre periférica debe ser de ≥ 6 horas (15, 20). Aunque esta técnica tiene altos porcentajes de sensibilidad y especificidad (94% y 91%, respectivamente) tiene varios inconvenientes: es importante que todos los hemocultivos estén bien identificados, es necesaria una rapidez de envío e inicio de incubación de los hemocultivos desde su extracción, el volumen de sangre extraído debe ser igual para cada hemocultivo, y es imposible aplicar este método para infecciones por levaduras o, polimicrobianas entre otras (21). Sin embargo, cuenta con la enorme ventaja de usar los nuevos sistemas automatizados para el procesamiento de

hemocultivos que determinan el tiempo transcurrido desde el inicio de la incubación de los frascos hasta el momento en que se detecta crecimiento significativo (6).

1.3.2. Técnicas diagnósticas con retirada del catéter.

Cuando se sospecha de una BRC, y siempre que sea posible la retirada del catéter, el cultivo de la punta junto con otros métodos microbiológicos, aportan el diagnóstico de certeza. La muestra que se procesará serán los últimos 5 cm de la punta del catéter (6). Es importante que tenga esta longitud ya que tamaños más pequeños pueden implicar la pérdida de la parte final de alguna luz de los catéteres multi-lumen.

Actualmente estas técnicas se clasifican en función de la vía de colonización del catéter: cultivo para detección extraluminal, intraluminal y ambas, así como técnicas rápidas.

❖ Cultivo para colonización extraluminal.

Esta técnica se basa en un cultivo semicuantitativo mediante el rodamiento de la punta del catéter unas 3 o 4 veces sobre una placa de agar sangre (6, 22). También conocida como técnica de Maki, debido a su descubridor, es un método sencillo y rápido para la detección de colonización de la superficie externa del catéter (22). Se considera como cultivo positivo aquellos con recuento ≥ 15 ufc/placa (1). Con una especificidad del 76% y por su gran simpleza, esta técnica ha sido aceptada por todos los laboratorios de Microbiología Clínica como técnica de referencia. Sin embargo, 2 de sus principales limitaciones son, que no permite el diagnóstico de la BRC de origen endoluminal y que solo utiliza un medio de cultivo, por lo que organismos nutricionalmente exigentes y anaerobios no serán detectados (6).

❖ Cultivo para colonización intraluminal.

Este cultivo consiste en lavar 3 veces las luces del catéter con 2 ml de TSB y posteriormente sembrar 0,1 ml de las diluciones 1:10 y 1:100. En este caso el umbral de positividad es de 1.000 ufc/ml. Sin embargo, como es una técnica que conlleva mucha manipulación, es muy susceptible de contaminación y solo se utiliza cuando es necesario conocer el origen de la BRC (6).

❖ Cultivo para colonización extra e intraluminal.

En este caso existen dos técnicas diagnósticas diferentes: la de Brun-Buisson (23) y la de la sonicación (24).

Brun-Buisson y cols. simplificaron la técnica de Cleri introduciendo el segmento del catéter en un tubo con 1 ml de agua destilada estéril y tras un minuto de agitación vigorosa con vórtex, sembraban 0,1 ml en una placa de agar sangre. Considerándose como positivo un punto de corte de $>10^3$ ufc/ml, obtuvieron una sensibilidad del 97,5% y una especificidad del 88% (6, 23).

Por otra parte, la técnica de la sonicación, descrita por Sherertz y cols. en 1990, es una técnica cuantitativa que se basa en introducir el catéter en 10 ml de caldo de enriquecimiento (TSB o BHI) y sonificarlo en un baño de ultrasonido durante 1 minuto para recuperar los microorganismos adheridos a las superficies tanto internas como externas del catéter. Tras la sonicación sembraban 0,1 ml de la solución original así como 0,1 ml de sus diluciones 1:10 y 1:100 y tomaron como nivel de positividad 100 ufc/ml, obteniendo una sensibilidad del 93%, una especificidad de 94%, un valor predictivo positivo de 72%, y un VPN de 99% (24). Recientemente, Guembe y cols. optimizaron esta técnica mediante la aplicación de la sonicación sobre la punta del catéter previamente

fragmentada (fragmentos de 2-5 mm) e introduciendo estos fragmentos en caldo de enriquecimiento del cual sembraron 0,1 ml en una placa de agar sangre (25). Sin embargo, esta técnica solo se realiza en los laboratorios de Microbiología Clínica cuando hay una sospecha alta de BRC, ya que este método supone una gran carga de trabajo para estos laboratorios (6).

Finalmente, en el caso especial de reservorios totalmente implantables, es necesario tanto el cultivo de la punta del catéter como el cultivo del reservorio, tras ser sonicado, para detectar la colonización del bolsillo, y mediante apertura de la membrana, para detectar colonización del interior (6, 25).

❖ Técnicas rápidas de diagnóstico de BRC con retirada del catéter.

Debido a que todas las técnicas requieren como mínimo de 18 a 24 horas para obtener un resultado preliminar, existen otras técnicas rápidas alternativas que se basan en la tinción de la punta del catéter (tinción de Gram y tinción con naranja de acridina) o en métodos moleculares (PCR 16S del ARNr o el uso de MALDI-TOF) (1, 2, 6). A pesar de su rapidez, estas técnicas no sustituyen al cultivo, ya que no permiten la identificación y posterior estudios de sensibilidad a los antimicrobianos de los microorganismos causantes de la infección (6).

1.4. Prevención y tratamiento de la BRC.

1.4.1. Prevención.

Existen numerosas medidas para prevenir la BRC, las cuales han demostrado funcionar cuando se introducen de manera conjunta más que aisladamente. Se pueden clasificar en medidas educacionales e intervencionistas.

❖ Educativas

Estas medidas se basan en la educación y el entrenamiento del personal sanitario encargado de insertar y mantener el catéter según las recomendaciones de las guías de prevención de la BRC.

Numerosos estudios de las pasadas cuatro décadas han demostrado que los programas educativos para personal sanitario encargados de insertar y mantener el catéter disminuyen significativamente los riesgos de infección (75). Equipos especializados en dispositivos intravasculares han demostrado una eficacia inequívoca en la reducción de la incidencia de las BRC, así como en sus complicaciones y sus costes (75). Adicionalmente, el riesgo de infección aumenta cuando el número de personal de enfermería disminuye hasta niveles críticos (77). Sin embargo, está bien demostrado que las medidas educativas sin apoyo de otras medidas adicionales no son suficientes, además requieren de una continuidad y seguimiento que, en general, es difícil de mantener en un Hospital de tercer nivel, debido a los numerosos cambios en el personal y falta de personal educador. Por ejemplo, Guembe y cols. (26) llevaron a cabo un estudio en el que demostraron que el conocimiento respecto a la BRC de los trabajadores sanitarios aumentaba significativamente tras un programa educativo basado en charlas de 20 minutos sobre las principales técnicas de prevención. Sin embargo, estos programas, por sí solos, no demostraron una reducción en la incidencia de las BRC en los servicios de estudio (26).

❖ Intervencionistas.

A su vez pueden llevarse a cabo durante la inserción o durante el mantenimiento del catéter.

- Inserción.

En cuanto a la inserción del catéter, se debe realizar con la adecuada higiene de manos, con soluciones alcohólicas o con agua y jabón en condiciones de asepsia, y con el uso de batas, guantes, gorro y mascarilla estériles, similares a los que se usan en un quirófano (27).

Otra de las medidas más importantes en la prevención de las BRC es la elección del sitio de inserción. La densidad de microbiota de la piel en el lugar de inserción del catéter es uno de los riesgos más importantes en este tipo de infecciones (27). De esta manera, se ha demostrado que la incidencia de BRC es mayor cuando la inserción del catéter se realiza en la vena femoral que cuando se realiza en la vena yugular o en vena subclavia, y mayor incidencia en aquellos catéteres insertados en la vena yugular que en la subclavia (28). Asimismo, la inserción en la vena femoral también se ha demostrado estar asociado con mayor riesgo de trombosis (27). Una vez elegido el sitio de inserción, se debe desinfectar la piel con clorhexidina alcohólica al 2% y considerar la técnica de imagen para facilitar el acceso vascular (15).

Por otra parte, el uso de catéteres recubiertos o impregnados de agentes antimicrobianos puede reducir el riesgo de BRC y potencialmente disminuir los costes hospitalarios que estas infecciones llevan asociados (27, 29). Estos catéteres liberan localmente una concentración alta de antimicrobianos evitando la colonización (29, 30). Por ejemplo, Raad y cols., diseñaron un nuevo tipo de catéter recubierto de minociclina-rifampicina-clorhexidina, demostrando que son más eficaces a la hora de prevenir la colonización comparados con los catéteres aprobados por la FDA, no sólo evitando la colonización por microorganismos más comúnmente causantes de BRC sino también de

microorganismos resistentes (como SARM, ERV, *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente, y levaduras del género *Candida* spp.) (31).

- **Mantenimiento.**

En el caso del mantenimiento del catéter también es necesario realizar una adecuada higiene de manos, con soluciones alcohólicas o con agua y jabón en condiciones de asepsia, así como utilizar soluciones alcohólicas para desinfectar piel y conectores antes de cualquier manipulación, utilizar guantes estériles, y cambiar los apósitos de gasa cada 2 días y los transparentes cada 7 días (27, 30). Asimismo, es también necesario vigilar diariamente el sitio de inserción, usar conectores cerrados en todas las luces del catéter, cambiar los sets de administración cada 7 días en condiciones de asepsia, y evitar mantener los catéteres que sean innecesarios (15).

Por último, las estrategias basadas en el uso de soluciones de sellado también han demostrado una reducción en la incidencia de las BRC. Estas estrategias se basan en la inyección de una solución antiséptica a través de la luz del catéter ocupando todo su volumen, dejándola actuar mientras el catéter esté sin usar (idealmente ≥ 24 h) (27, 30). Los antisépticos más utilizados son los alcoholes, la taurolidina, y la taurolidina-citrato (27). Estos agentes generalmente se combinan con compuestos anticoagulantes como la heparina o el EDTA para evitar la oclusión y mantener la integridad del catéter (27, 32).

1.4.2. Tratamiento.

Cuando existe sospecha de BRC se debe prescribir tratamiento antibiótico sistémico incluso antes de tener los resultados de los hemocultivos, además de la retirada del catéter lo antes posible. El tratamiento empírico inicial debe tener actividad frente a

cocos Gram-positivos y Gram-negativos, con ajuste del antibiótico una vez se tengan los resultados microbiológicos (**tabla 3**) (33).

Tabla 3. Terapia antibiótica empírica según sospecha (15, 34).

Microorganismo	Elección	Indicaciones
Gram +	Vancomicina/daptomicina	Cubrir siempre SARM, ECN-RM
Gram -	Según epidemiología local	Cubrir multi-R en neutropénicos, gravedad o colonización por multi-R.
Levaduras	Candina/Fluconazol (según epidemiología local)	-Factores de riesgo (neutropenia, trasplante). - Vía femoral. - NPT - Uso de antibióticos de amplio espectro. - Colonización por <i>Candida</i> spp.

SARM, *S. aureus* resistente a la metilina; **ECN-RM**, Estafilococo coagulasa negativo resistente a la metilina; **multi-R**, multi-resistentes; **NPT**, nutrición parenteral total.

Una vez se obtengan los resultados microbiológicos, el tratamiento se debe adecuar al microorganismo hallado. En caso de *S. aureus* y ECN sensibles a metilina el tratamiento de elección es cloxacilina o cefazolina, mientras que para aquellos resistentes a metilina el tratamiento de elección es un glicopéptido como la vancomicina o teicoplanina y la duración debe ser de 5 a 7 días en ECN y 14 días para *S. aureus* (7, 15, 34). Respecto a los bacilos Gram-negativos, el tratamiento debe basarse en el panel de sensibilidad antibiótica y debe tener una duración como mínimo de 7 días recomendándose de 10 a 14 días (15, 34). En los casos de candidemia por *Candida* spp. se recomienda usar agentes con actividad anti-biofilm como equinocandinas o fluconazol (dependiendo de la sensibilidad) o formulaciones lipídicas de anfotericina B con una duración de 14 días tras el primer hemocultivo negativo (7, 15, 33, 34).

La retirada del catéter es indispensable cuando ocurre un episodio de BRC complicado (endocarditis, tromboflebitis supurativa, infección del túnel, shock séptico, fiebre no resuelta o bacteriemia persistente de más de 3 días) o causado por *S. aureus*, *Candida* spp., *P. aeruginosa*, *Bacillus* spp., *Micrococcus*, o *Propionibacterium* spp. (3, 7, 34). Sin embargo, en determinadas situaciones, como pacientes hematológicos, trasplantados o en hemodiálisis, donde no existe otro acceso vascular accesible y la retirada del catéter no se puede realizar, se recomienda realizar el tratamiento con la conservación del catéter (35, 36). Para ello, se debe combinar el tratamiento antimicrobiano sistémico con las terapias de sellado o de cierre con antibióticos (34).

Las soluciones de sellado con antibióticos más utilizados son la vancomicina, gentamicina, ciprofloxacino, minociclina, amikacina, cefazolina, cefotaxima, y ceftazidima.

2. Neumonía asociada a ventilación mecánica.

2.1. Epidemiología, patogenia y etiología.

2.1.1. Epidemiología.

La neumonía asociada a ventilación mecánica se define como una infección pulmonar nosocomial que aparece al menos 48 horas después de la intubación y se caracteriza por la presencia de un nuevo infiltrado pulmonar, signos de infección sistémica, cambios en las características de los esputos, y detección de un agente causal (37, 38).

Se estima que la incidencia varía entre 10-20 episodios de NAVM por cada 1.000 días de ventilación mecánica (39-41). Sin embargo, esta incidencia varía dependiendo del país e incluso de la institución. Así, los últimos estudios de incidencia de NAVM en América reportan unos valores de 1 a 8,5 casos de NAVM por cada 1.000 días de ventilación mecánica en comparación con estudios europeos (37, 42). Sin embargo, los últimos datos de incidencia de NAVM en España reportan una mediana de 8,7 episodios por cada 1.000 días de ventilación mecánica (43). Esta gran diferencia entre países se podría explicar por una mejora en la implementación de las medidas de prevención de la NAVM o, simplemente por una heterogeneidad en la definición y el diagnóstico de la NAVM a lo largo del tiempo, con discrepancias entre diferentes hospitales (40, 42).

La NAVM se relaciona con altas tasas de morbi-mortalidad, estancias hospitalarias prolongadas y elevados costes asociados (41, 44). Según antiguos estudios, la mortalidad asociada a la NAVM era del 33-50%, siendo esta cifra muy variable dependiendo de la enfermedad de base de cada paciente (37, 45). Sin embargo, la tasa de mortalidad ha ido disminuyendo gracias a la implementación de medidas preventivas, alcanzando unos porcentajes de aproximadamente 9-13% (37, 40, 42, 44).

Asimismo, otra variable que afecta al pronóstico del paciente es el tiempo de aparición de la NAVM. Las apariciones tardías (>5 días tras la intubación) se relacionan con microorganismos multi-resistentes y, por tanto, con un peor pronóstico y mayor mortalidad, en comparación con la aparición de la NAVM temprana (< 4 días tras la intubación) (42).

Respecto al impacto económico, se estima que cada caso de NAVM cuesta aproximadamente 40,000 dólares ó 29.431 euros, debido fundamentalmente a estancias prolongadas en las UCIs (39, 42, 45).

2.1.2. Patogenia.

Existen diversas vías por las cuales los patógenos pueden causar NAVM en el ambiente hospitalario. Estas vías de infección se clasifican como: exógenas, aquellas que provienen del ambiente (como por ejemplo mediante aerosoles de aire contaminado, por contacto con otros pacientes infectados, por transmisión mediante el personal hospitalario, o mediante dispositivos médicos como circuitos de ventilación humidificadores...); y endógenas, aquellas que provienen del propio paciente (como por ejemplo por micro-aspiraciones de la flora orofaríngea del paciente) (figura 2) (45).

Sin embargo, el principal factor de riesgo en el desarrollo de la NAVM es la introducción de un cuerpo extraño, el tubo endotraqueal, en las vías aéreas (46). El tracto respiratorio tiene multitud de mecanismos de defensa que normalmente actúan en conjunto para proteger a los pulmones de una infección. Entre estos mecanismos destacan las barreras anatómicas (la glotis y la laringe), tos, secreciones traqueobronquiales, aclaramiento mucociliar, y la respuesta inmune, tanto humoral como fagocítica mediante macrófagos y neutrófilos (47). Cuando el paciente es

intubado, todas estas defensas se alteran, variando el equilibrio microbiano de las vías aéreas y aumentando las opciones de estos microorganismos para alcanzar el tracto respiratorio inferior y causar la infección (37, 45, 46). Además, la intubación traqueal favorece el flujo de microorganismos patógenos desde la orofaringe hasta los pulmones mediante el paso de secreciones contaminadas a través del neumo-taponamiento del tubo, que se van almacenando en el espacio subglótico, así como de secreciones gastro-pulmonares, que suben desde el estómago (48). Esta translocación de las bacterias desde el estómago a los pulmones (42) ocurre porque en pacientes críticos el estómago se alcaliniza por la nutrición enteral y los medicamentos intravenosos (47). Esta alcalinización promueve la colonización estomacal por patógenos que son capaces de alcanzar los pulmones mediante una vía ascendente (reflujo gastroesofágico) por translocación desde el estómago hasta la orofaringe (42).

Por otro lado, los microorganismos colonizadores del tracto respiratorio son capaces de formar biopelículas en la superficie, tanto interna como externa, del TET proporcionándoles un microambiente protegido y dificultando su erradicación (18, 47, 48). Asimismo, durante las técnicas de succión de las secreciones, el biofilm se disgrega favoreciendo la dispersión de los patógenos (48).

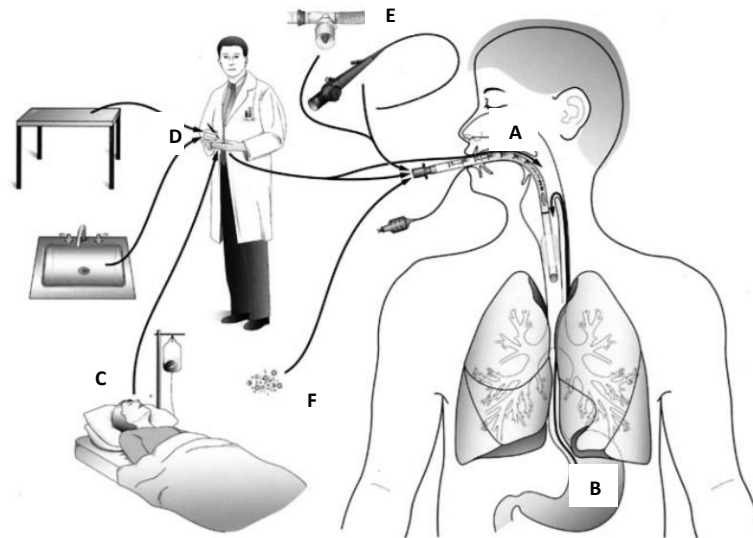


Figura 2. Rutas de colonización/infección en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica.

Estas vías pueden ser: endógenas (A, por la orofaringe; B, mediante la ruta gastro-pulmonar); y exógenas (C, contacto con pacientes infectados; D, por la manipulación del personal sanitario; E, mediante aparatos infectados; y F, mediante aerosoles contaminados). Imagen obtenida de Safdar N, “The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention” (2005) (49).

2.1.3. Etiología.

El tipo de microorganismo que causa NAVM generalmente depende de la duración de la ventilación mecánica. En general, las NAVM tempranas (<4 días tras la intubación) suelen estar causadas por microorganismos sensibles a los antibióticos, mientras que las NAVM más tardías (>5 días tras la intubación) suelen estar representadas por microorganismos multi-resistentes, que son más difíciles de erradicar (37).

Los principales microorganismos causantes de NAVM tempranas incluyen: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, SASM, diferentes especies de *Enterococos*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Serratia marcescens* (37, 42, 50).

Las principales bacterias que causan NAVM tardía son: *Pseudomonas aeruginosa*,

Acinetobacter spp., SARM, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, y bacterias productoras de beta-lactamasas de amplio espectro como *Klebsiella pneumoniae* (37, 42). Finalmente, las NAVM causadas por levaduras y virus son poco frecuentes, pero entre ellas destacan especies como *Candida albicans*, virus herpes, o citomegalovirus (42).

2.2. Diagnóstico de la NAVM.

A día de hoy, todavía no existe un método universal aceptado o estándar de oro para el diagnóstico de la NAVM (37). Sin embargo, se acepta que el diagnóstico debe ser una combinación entre la clínica y la microbiología.

2.2.1. Diagnóstico clínico.

El diagnóstico clínico se basa en la presencia de nuevos o progresivos infiltrados en una radiografía de tórax junto con, al menos, dos de los tres criterios clínicos: fiebre mayor a 38°C, leucocitos o leucopenia, y secreciones purulentas. Estos signos representan un diagnóstico certero para el comienzo del tratamiento empírico (39, 42, 46, 51). Sin embargo, estos datos clínicos no son específicos de la NAVM.

Para aumentar esta especificidad, Pugin y cols. desarrollaron el score de la infección clínica pulmonar (CPIS) que combina datos clínicos, radiológicos, fisiológicos, y microbiológicos en un valor numérico (**Tabla 4**). Según esta escala, un valor mayor a 6 (CPIS>6) sería indicativo de NAVM (42, 48, 51, 52).

Tabla 4. CPIS usado para el diagnóstico de NAVM (52).

Aspecto diagnóstico	Puntos
Temperatura (°C)	
≥36,5 y ≤38,4	0
≥38,5 y ≤38,9	1
≥39 o ≤36,0	2
Leucocitos en sangre (mm⁻³)	
≥4.000 y ≤11.000	0
<4.000 o >11.000; formas en banda ≥ 500	1+1
Secreciones traqueales	
<14+	0
>14+; secreciones purulentas	1+1
Oxigenación: Pao/Flo2' mm Hg	
>240 o SDRA	0
≤240 o sin signos de SDRA	2
Radiografía pulmonar	
Sin infiltrados	0
Con infiltrados difusos	1
Infiltrados localizados	2
Cultivo del aspirado traqueal	
Sin crecimiento	0
Cultivo positivo; mismo microorganismo en la tinción de Gram	1+1

SDRA, síndrome de distrés respiratorio del adulto.

2.2.2. Diagnóstico microbiológico.

Debido a la baja especificidad del diagnóstico clínico, es necesario obtener muestras microbiológicas para confirmar el diagnóstico e identificar el patógeno responsable de la infección y poder adecuar el tratamiento (39). Existen varios métodos de toma de muestra y cultivo para las muestras respiratorias: cultivos cuantitativos de muestras obtenidas por métodos invasivos como lavados bronco-alveolares o cepillado bronquial mediante catéter telescópico, y cultivos semicuantitativos por métodos no invasivos

como aspirados traqueales. Estos últimos son lo más recomendados por las guías frente a los métodos invasivos (53).

En caso de realizar cultivos cuantitativos tanto de métodos invasivos como no invasivos, existen diferentes puntos de corte para el diagnóstico de la NAVM dependiendo del tipo de toma de muestra usado (Tabla 5).

Tabla 5. Puntos de corte para el diagnóstico de la NAVM mediante cultivos cuantitativos (42).

Técnica de toma de muestra	Positividad (ufc/ml)
Aspirados endotraqueales	10^5
Lavados bronco-alveolares	10^4
Cepillados bronquiales	10^3

2.3 Prevención y tratamiento de la NAVM.

2.3.1. Prevención.

Existen numerosas estrategias preventivas para la NAVM que han resultado ser mucho más efectivas en su conjunto que individualmente (40, 42). Estas medidas se pueden clasificar en dos grandes grupos: farmacológicas y no farmacológicas.

Las medidas **farmacológicas** se basan en la descolonización de la orofaringe y del estómago (42). Principalmente, estas medidas se basan en el uso de soluciones antisépticas para una adecuada higiene oral del paciente y el uso de soluciones digestivas/orales descontaminantes (51, 54, 55). Estas soluciones, formadas principalmente por antibióticos tópicos no absorbibles (un aminoglicósido, polimixina B, y anfotericina), combinadas con terapia sistémica profiláctica, generalmente cefotaxima o fluoroquinolonas, se aplican en la boca y en el estómago para erradicar bacterias y

levaduras potencialmente patogénicas que puedan causar la infección (48, 56). Pérez-Granda y cols. han demostrado que el uso de soluciones digestivas descontaminantes disminuye el riesgo de la aparición de NAVM en pacientes de cirugía cardíaca (57). Además, también demostraron que este tipo de soluciones no tienen un impacto negativo sobre la aparición de microorganismos multi-resistentes (57).

Entre las medidas **no farmacológicas** destacan la higiene de manos del personal sanitario encargado de manipular los sistemas de ventilación y los TET de los pacientes intubados con soluciones alcohólicas, mantener la presión del neumo-taponamiento siempre entre 25-30 mm Hg, aspirar las secreciones acumuladas en el espacio subglótico, modificar la posición corporal de una posición completamente en supino (0 grados) a una semisentada (30-45 grados), acortar el tiempo de ventilación mecánica lo máximo posible, y usar TET modificados con plata o que tengan un sistema para el drenaje de las secreciones subglóticas (40, 42, 45, 46, 53, 54, 58-60).

2.3.2. Tratamiento.

El tratamiento de la NAVM se basa en la terapia antimicrobiana en dos pasos diferentes: administración sistémica de antibióticos de forma empírica y posteriormente, una vez identificado el agente etiológico, de forma dirigida (48).

Administración empírica de antibióticos sistémicos: Se realiza frente a los microorganismos que, más comúnmente, causan NAVM (61). El criterio de elección del antibiótico empírico se tiene que basar en el patrón de resistencia antimicrobiana que tenga cada institución (48, 62). Por lo general, cuando la aparición de la neumonía es precoz se suele optar por monoterapia con amoxicilina-clavulánico (1-2g/8h), cefalosporinas no anti-pseudomónicas (2g/24h), levofloxacino (500mg/12-24h) o, en

algunos casos, ertapenem (1g/24h) (39, 46, 63). En caso de aparición tardía, el tratamiento empírico de elección suele ser un carbapenémico con actividad anti-pseudomónica (1-2g/8h), piperacilina-tazobactam (4g/8h), cefepima (1-2g/8-12h) o ceftazidima (2g/8h), combinado con un segundo fármaco anti-pseudomónico como ciprofloxacino (400mg/8h). Considerar vancomicina (20mg/kg/12h) o linezolid (600mg/12h) si existe riesgo alto de SARM (39, 63).

Desescalamiento: una vez el agente etiológico es identificado, se debe desescalar y elegir un antibiótico dirigido al microorganismo (48). En estos casos, se puede reducir el tratamiento eliminando la vancomicina o el linezolid si no hay presencia de SARM (39).

Otra de las estrategias terapéuticas es el uso de **antibióticos aerosolizados**, debido a que la penetración de los antibióticos intravenosos en el pulmón es limitada y tienen riesgos de toxicidad sistémica (42). De esta manera se obtienen concentraciones más altas en el pulmón aumentando la actividad antimicrobiana y la toxicidad sistémica es marginal (42, 62). Sin embargo, el uso de estos aerosoles conlleva también riesgos asociados por los efectos adversos que pueden producir como bronco-espasmos, hipoxia o nefrotoxicidad (64).

Respecto a la duración del tratamiento, todavía existen controversias sobre el tiempo adecuado (39). Sin embargo, se consensua que, si inicialmente el antibiótico elegido era el correcto, la duración del tratamiento no debería exceder los 7 días excepto en casos de *P. aeruginosa* XDR, *A. baumannii* multi-resistente, o enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas (51, 63).

3. Biofilm.

3.1. Aspectos generales.

El biofilm o biopelículas de microorganismos se define como una comunidad microbiana, tanto monomicrobiana como polimicrobiana, embebida en una matriz extracelular producida por el propio microorganismo que, generalmente, se encuentra adherida a una superficie (65, 66). El 80-99% de los microorganismos del planeta se encuentran en estado sésil considerándose el biofilm como la forma predominante de vida microbiana en la naturaleza (67, 68). Estas células suelen tener fenotipos diferentes a sus correspondientes células planctónicas, con una alta capacidad de colonizar nuevas superficies y una gran tolerancia a estrés medioambiental (69).

Anthony van Leeuwenhoek (1632–1723) describió por primera vez esta estructura microbiana al observar al microscopio muestras de su propia boca donde ya observó la agregación de diferentes microorganismos rodeados por una matriz extracelular (65, 70, 71). Sin embargo, el término biofilm no se usa solo en microbiología clínica. Fue el célebre microbiólogo Louis Pasteur (1822-1895) quién describió por primera vez este fenómeno en muestras alimenticias relacionando la acidificación del vino con la presencia de estos agregados bacterianos (72). Durante el siguiente siglo, el interés por las biopelículas microbianas disminuyó hasta tal punto que incluso había microbiólogos que no conocían este concepto. No fue hasta 1933 cuando Henrici volvió a introducir el concepto de “biofilm” en el mundo microbiológico tras el estudio que realizó sobre la suciedad biológica que existía en el agua, concluyendo que los microorganismos no viven como organismos libres flotantes sino como agregados microbianos (71, 72). Fue a partir de este año cuando el término biofilm fue adquiriendo mucho más interés e importancia

hasta llegar a observarse en el ámbito clínico, donde las infecciones relacionadas con la formación de biofilm se han convertido en un gran problema por todo lo que conllevan, como la resistencia a antimicrobianos, infecciones crónicas y persistentes e, incluso, en ciertos pacientes, la muerte (73, 74).

3.2. Fases de la formación del biofilm.

La formación del biofilm requiere la transcripción de sets de genes diferentes a los transcritos en la forma planctónica del mismo tipo de microorganismo, así como comunicación entre célula-célula, también llamada “quorum sensing” (70). La formación de biofilm es un proceso complejo que engloba 5 etapas diferentes: transporte de los microorganismos a la superficie, adhesión inicial, formación de micro-colonias, maduración del biofilm, y dispersión (75) (figura3).

3.2.1. Transporte de los microorganismos a la superficie y adhesión inicial.

Las bacterias o levaduras en estado planctónico alcanzan la superficie y comienzan a adherirse de una forma normalmente reversible (73). Esta adhesión está influenciada por fuerzas atractivas o repulsivas que varían dependiendo del nivel de nutrientes, pH, fuerzas iónicas y temperatura, así como del material al que se adhieran (preferiblemente hidrofóbico y rugoso) (75, 76). Una vez alcanzada la superficie, las bacterias y levaduras se adhieren a ella usando estructuras celulares como los flagelos, las fimbrias o proteínas de adhesión mediante fuerzas de van der Waals, dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas o fuerzas hidrofóbicas, pasando a obtener una unión irreversible a la superficie (70, 71, 77).

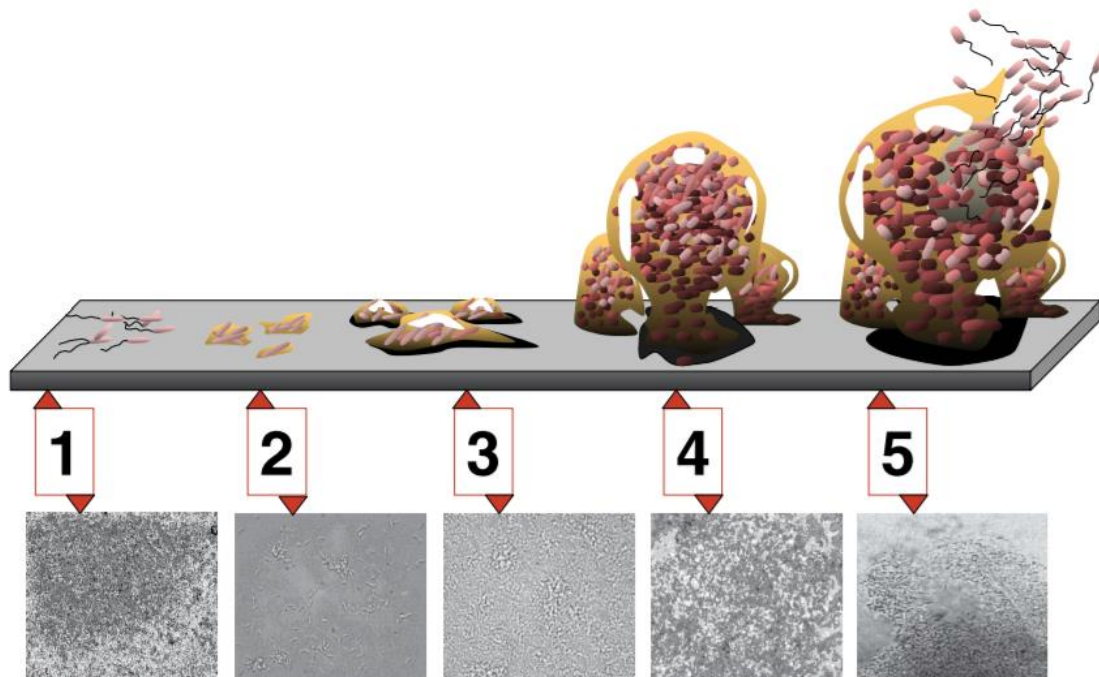


Figura 3. Fases de la formación del biofilm: **1.** Aproximación de los microorganismos a la superficie; **2.** Adhesión inicial; **3.** Formación de micro-colonias; **4.** Maduración del biofilm; **5.** Dispersión. Imagen obtenida de Monroe D. "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms". (2007) (78).

3.2.2. Formación de microcolonias.

La formación de micro-colonias tiene lugar una vez las bacterias se han adherido físicamente a una superficie o a un tejido biológico (71, 75). La adhesión a estas superficies se convierte en estable y comienza el proceso de reproducción y división microbiana, iniciada principalmente por señales químicas específicas para la formación del exopolisacárido de la matriz (70, 76, 77). Las células microbianas comienzan a duplicarse rodeadas del exopolisacárido y sustancias extracelulares poliméricas, formando micro-colonias coordinadas entre sí que comienzan a crecer cubriendo la superficie (70).

3.2.3. Maduración del biofilm.

El crecimiento de la micro-colonias provoca que las células se comuniquen entre sí mediante moléculas de señalización creando canales de agua entre ellas mediante los cuales se produce un intercambio de nutrientes y sustancias que contribuyen a la homeostasis del biofilm (76). Además, se produce un cambio en el patrón de los genes transcritos, induciéndose genes que contribuyen a la formación y desarrollo de colonias sésiles y a una mayor expresión de exopolisacárido (70). A medida que el biofilm va creciendo, el EPS protege a estas colonias del estrés medioambiental y más microorganismos se van adhiriendo a esta primera monocapa, de tal manera que el biofilm crece y madura obteniendo una estructura en 3D característica, también conocido como estructura de champiñón o de torre (>100 capas de microorganismos) (79).

3.2.4. Dispersión.

Los microorganismos son capaces de desprenderse de las capas más externas del biofilm mediante fuerzas externas o como parte de un movimiento migratorio promovido por los efectos de un flujo de fluido continuo (76). Sin embargo, esta dispersión también ocurre como un proceso natural de la formación del biofilm microbiano. Las bacterias u hongos embebidos en la matriz extracelular dejan de producir EPS y aumenta la síntesis de enzimas sacarolíticas, en respuesta a una depleción de nutrientes, volviendo a su forma planctónica (70, 77). Este nuevo fenotipo les permite reproducirse más rápido y colonizar nuevas superficies (66, 80).

3.3. Componentes del biofilm.

Aunque los principales protagonistas del biofilm son los microorganismos, éstos solo representan un 2-5% de la masa total de estas estructuras (76). Los principales componentes de las biopelículas se concentran en la ME (**tabla 6**), cuya composición varía dependiendo de la especie y/o de las condiciones de crecimiento (81).

Tabla 6. Componentes y porcentaje de masa que representan en un biofilm microbiano (76).

COMPONENTE	% DE MASA DEL BIOFILM
Agua	>97%
Microorganismos	2-5%
Polisacáridos	1-2%
Proteínas	<1-2%
ADN y ARN	<1-2%

La ME se compone de diferentes EPS (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos extracelulares) que mantienen la estructura en 3D de estas comunidades microbianas (69). Esta matriz también actúa como un centro de reciclaje guardando todos los restos de células lisadas que quedan disponibles como nutrientes para el resto de bacterias presentes en el biofilm (82).

Aunque cada especie, bacteriana o fúngica, secreta diferentes homopolisacáridos, la mayoría de los exopolisacáridos que se encuentran en la matriz son heteropolisacáridos neutros o residuos de azúcar cargados. Pueden contener radicales orgánicos u inorgánicos que afectan a las propiedades tanto físicas como biológicas del biofilm (p. e. alginato, xantano o ácido colánico) (82).

Otro de los principales componentes de la ME son las proteínas, que se dividen en enzimas líticas, encargadas de destruir los expolisacáridos y por ende, están relacionadas con la fase de dispersión; y las proteínas estructurales, sin acción enzimática, que se encargan de estabilizar toda la matriz polisacáridica y de conectar las bacterias desde su superficie con las EPS (81, 82).

Por otro lado, el ADN también forma parte de la ME siendo un componente estructural muy importante (81). Antiguamente se pensaba que este ADN provenía de células lisadas hasta que Mattick y sus colaboradores se dieron cuenta de que añadiendo ADNsa I prevenía la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, concluyendo que el ADN se secreta activamente durante la formación del biofilm (79). El ADN se caracteriza por tener carga negativa lo que le permite actuar como una fuerza repulsiva durante la fase inicial de adhesión. Sin embargo, cuando la distancia entre las células y la superficie de la matriz es lo suficientemente pequeña (de pocos nanómetros) el ADN interactúa con receptores celulares facilitando la adhesión (81, 83, 84). Aunque la cantidad de ADN en la ME depende de la especie, su carga negativa le permite repeler y quelar antibióticos cargados positivamente contribuyendo a la resistencia que presentan los biofilms (79, 82).

3.4. Implicación del biofilm en el proceso de infección, evasión de la respuesta inmune y resistencia a antibióticos.

Los biofilms tienen un gran significado dentro de la salud pública ya que los microorganismos que son capaces de formar estas estructuras presentan altas tasas de resistencia a los antibióticos, son capaces de evadir el sistema inmune y causan infecciones crónicas difíciles de tratar (85, 86).

Se estima que aproximadamente un 65% de las infecciones bacterianas se deben a la formación de biofilm y, teniendo en cuenta sus mecanismos de resistencia tanto a antimicrobianos como al ataque del sistema inmune, representan un gran peligro en el ámbito sanitario (70).

Las infecciones causadas por biofilm (**figura 4**) se pueden clasificar en infecciones de tejidos sin adhesión a una superficie extraña (p.e. endocarditis, osteomielitis, fibrosis quística, placa dental...), o asociadas a dispositivos médicos (18, 87). Estas últimas representan un 60-70% de todas las infecciones relacionadas con el biofilm y se relacionan con especies bacterianas o fúngicas que suelen encontrarse en el agua, en el medioambiente, o son parte de la microbiota de la piel humana tanto del paciente como del personal sanitario (87, 88).

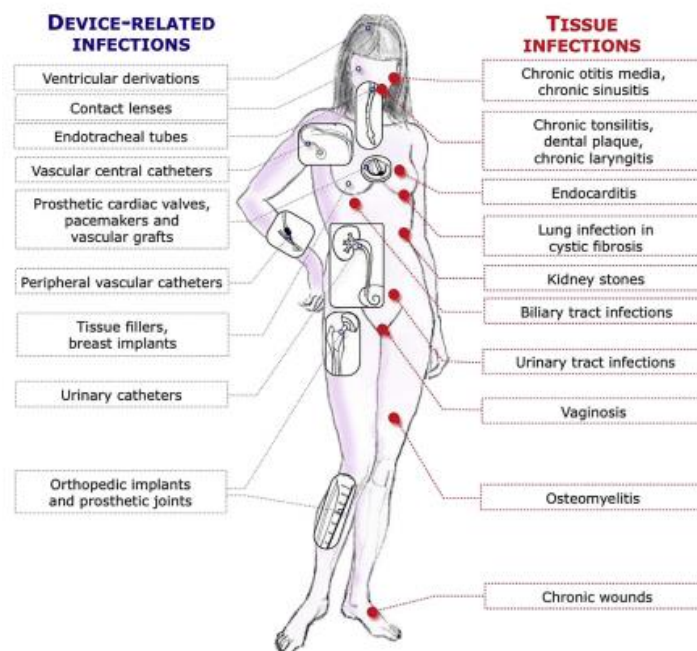


Figura 4. Infecciones típicas causadas por biofilms. Imagen obtenida de las guías de diagnóstico y tratamiento de infecciones causadas por biofilm realizadas por el grupo de estudio del biofilm del ESCMID en 2014 (18).

Existen varias teorías sobre la disminución de la susceptibilidad antibiótica de los microorganismos presentes en un biofilm frente a sus formas planctónicas. La primera mantiene que la difusión de los antibióticos es muy lenta e incluso incompleta debido a la ME (89). Además de servir como barrera física, se ha demostrado que la ME es capaz de diluir y neutralizar las moléculas antimicrobianas (89, 90). Otra de las teorías propuestas es la baja eficacia de los antimicrobianos debido a un crecimiento celular ralentizado (90). Finalmente, la última teoría, propuesta por Soto y cols., describe la expresión de multitud de genes que codifican bombas de expulsión y que se ven inducidos en los biofilms (91).

Además, estas comunidades microbianas son capaces de evadir el sistema inmune del hospedador. Aunque la respuesta inmune innata se desencadena según aparecen los primeros signos de infección y es capaz de promover una respuesta inmune humoral activando linfocitos T helper de tipo 2 y T helper de tipo 1 (18), esta no llega a ser efectiva para el eliminar el biofilm (92). Los polimorfonucleares, dependiendo de la pared bacteriana, son capaces de penetrar en el biofilm mediante los canales de nutrientes que se establecen en los biofilms maduros (92). Sin embargo, presentan una actividad fagocítica descompensada disminuyendo su capacidad para matar las bacterias (92, 93). Por otra parte, los macrófagos tampoco son capaces de fagocitar a estas bacterias. A medida que los macrófagos se van acercando a la superficie del biofilm, van entrando en contacto con las enzimas líticas bacterianas y mueren sin poder desempeñar su función (93).

3.5. Métodos diagnósticos de las infecciones relacionadas con el biofilm en el laboratorio de Microbiología Clínica.

El diagnóstico de las infecciones relacionadas con biopelículas es un fenómeno multidisciplinar basado en la historia clínica del paciente, donde se recogen sus signos y sus síntomas, y en los hallazgos microbiológicos (94).

Primeramente, es necesario recoger la muestra adecuada para que sea transportada al laboratorio de microbiología donde será procesada. El tipo de muestra recogida dependerá de la patología que se sospeche y del lugar de infección (18). Cabe destacar que la detección de biopelículas en muestras biológicas no es un proceso sencillo ya que, la mayoría de las veces, es necesario destruir o desprender ese biofilm para poder obtener al microorganismo responsable, de manera que las características de células sésiles se pierden pasando a estado planctónico alterándose, sobre todo, su sensibilidad antibiótica (90, 94). En la **tabla 7** se recogen los métodos diagnósticos de infecciones relacionadas con biopelículas y sus principales ventajas y desventajas.

Aun así, la única forma de detectar una biopelícula es mediante microscopía, que previamente haya mostrado evidencias de un proceso infeccioso en curso como puede ser la presencia de leucocitos y de microorganismos agregados y embebidos en una matriz propia (18, 94). Este análisis microscópico se puede realizar usando microscopios ópticos de rutina mediante tinciones tan simples como la tinción de Gram, que tiñe tanto el tejido como las células inflamatorias, las bacterias, y la ME del biofilm (18, 94). Otras técnicas de microscopía usadas para la detección de biofilm serían la microscopía láser confocal y la microscopía electrónica de barrido. Sin embargo, estas técnicas no se

encuentran disponibles como uso en el diagnóstico de rutina en el laboratorio de Microbiología Clínica (18, 94).

Otras técnicas usadas para la detección de infecciones relacionadas con biopelículas son el cultivo convencional y las técnicas moleculares (18, 94, 95). Sin embargo, estas técnicas no son capaces de detectar el biofilm *persé* y por tanto no discriminan entre células planctónicas y células sésiles (18).

Tanto para el cultivo como para el uso de técnicas moleculares es necesario liberar a los microorganismos del biofilm. Esta liberación se puede conseguir mediante la sonicación u homogenización de la muestra seguido de vórtex vigoroso, rascado, o técnicas de rodamiento, seguido de un cultivo semi-cuantitativo (18). Es posible que algunos microorganismos agregados en biofilms no sean capaces de crecer en los medios de cultivo convencionales usados en el laboratorio de Microbiología Clínica, pero sí ser viables, fenómeno denominado “viable but not culturable” (VBNC) cells (18, 96). Cuando esto sucede, o cuando el cultivo convencional es negativo pero el facultativo tiene altas sospechas de infección, se recurren a los métodos moleculares. Estos métodos se basan en la técnica de la PCR. Existen dos tipos de PCR que se usan para la detección de microorganismos una vez la biopelícula ha sido desprendida y disgregada. Las PCR universales, que se basan en la amplificación del gen que codifica la subunidad 16S ribosomal, en caso de bacterias, o el gen 18S ribosomal en caso de hongos, permitiendo la identificación y cuantificación del microorganismo (95); y las PCR específicas que pueden detectar tanto ADN como ARN específicos y conservados para cada tipo de microorganismo (94).

Tabla 7. Principales métodos de diagnóstico de las infecciones asociadas con biopelículas (18, 97).

Método	Ventajas	Inconvenientes
Microscopía óptica	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la visualización del biofilm. - Técnica barata, sencilla y poco laboriosa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Poca sensibilidad.
Microscopía láser confocal	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la visualización del biofilm. - Demuestra la viabilidad de los microorganismos. - Mayor sensibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipamiento estructural complejo y caro. - Requiere formación específica. - Poca experiencia en el diagnóstico clínico.
Microscopía electrónica de barrido	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la visualización del biofilm. - Sensibilidad alta. 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipamiento estructural complejo y caro. - Requiere formación específica. - Requiere un tratamiento de la muestra muy laborioso.
Cultivo convencional	<ul style="list-style-type: none"> - Método de referencia para la detección de microorganismos. - Poco laborioso. 	<ul style="list-style-type: none"> - No distingue entre células planctónicas y células sésiles. - Es susceptible de contaminación. - Puede proporcionar falsos negativos.
PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidad. - Permite obtener el resultado en pocas horas. 	<ul style="list-style-type: none"> - No distingue entre células planctónicas y células sésiles. - Requiere disrupción del biofilm. - Baja sensibilidad analítica. - Es susceptible de contaminación. - Alto coste.

3.6. Estrategias de tratamiento y prevención del biofilm.

Incluso antes de encontrar la relación entre las biopelículas y la enfermedad en los pacientes, se desarrollaron diferentes estrategias para prevenir la colonización microbiana o erradicarla una vez establecida (30). Sin embargo, todos estos métodos se basaban en estudios de células en estado planctónico sin tener en cuenta las características de los biofilms (30). Durante muchas décadas, el uso de antimicrobianos, a altas concentraciones, ha sido el principal tratamiento para las infecciones relacionadas con el biofilm, tanto de tejidos como relacionadas con dispositivos biomédicos, con altas tasas de fracaso (95, 98). Por ello, durante los últimos años, los esfuerzos se han dirigido al desarrollo de nuevas moléculas que actúen específicamente sobre las biopelículas (30, 67, 71, 75, 98). Entre las estrategias más avanzadas para combatir este tipo de infecciones destacan estrategias basadas en la prevención de la formación del biofilm (soluciones antibióticas de sellado de catéter, modificaciones de las superficies de los biomateriales, o el uso de agentes anti-adhesivos); estrategias bactericidas basadas en la erradicación de micro-colonias y del biofilm maduro (como el uso de fagos o nanopartículas, interferencia en el sistema de “quorum sensing”, etc), y estrategias basadas en la manipulación de la dispersión del biofilm (agentes activadores de la cascada de señalización de c-di-GMP) (figura 5) (75). Sin embargo, la mayoría de estas aproximaciones terapéuticas todavía están en fases experimentales.

3.6.1. Modificaciones de las superficies de los biomateriales y uso de agentes anti-adhesivos.

Por otro lado, la modificación de la superficie del material biomédico ha resultado de gran utilidad en la prevención de infecciones relacionadas con el biofilm *in vitro* (99). Estas modificaciones se pueden clasificar como modificaciones químicas o modificaciones físicas (100). Entre las modificaciones químicas destacan, entre otras, la manipulación de la hidrofobicidad y/o la carga de la superficie. La adhesión bacteriana a una superficie depende tanto de la hidrofobicidad de dicha superficie como de la hidrofobicidad de la propia célula, así como de sus cargas (100). Es comúnmente aceptado que las células hidrofóbicas se adhieren mejor a las superficies y que las bacterias tienden a unirse más fuertemente a superficies hidrofóbicas, ya que la unión entre dos elementos hidrofóbicos se ve favorecida por interacciones fuertes (100, 101). En relación a la carga, la superficie bacteriana está cargada negativamente, por lo que las bacterias se adhieren mejor a superficies con carga positiva por fuerzas de atracción (101). Así, reconfigurando las propiedades químicas de los biomateriales, es posible atenuar la adhesión, y por tanto la propagación y formación de las biopelículas (101, 102).

Dentro de las modificaciones físicas destaca la alteración de la topografía del material. Aunque la relación entre la rugosidad de la superficie y la adhesión bacteriana todavía está en discusión, existen estudios que mantienen que las irregularidades del material que midan por encima de 100 nm modulan la adhesión de la bacteria al material (103, 104). De esta forma, las superficies que poseían alteraciones que eran significativamente más pequeñas que el tamaño de la bacteria, demostraron reducir la

adhesión de los microorganismos al material (103). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existe una conexión estrecha entre las características químicas y la topografía de una superficie, de tal manera que la hidrofilia de una superficie aumenta con el aumento de la rugosidad del material (102).

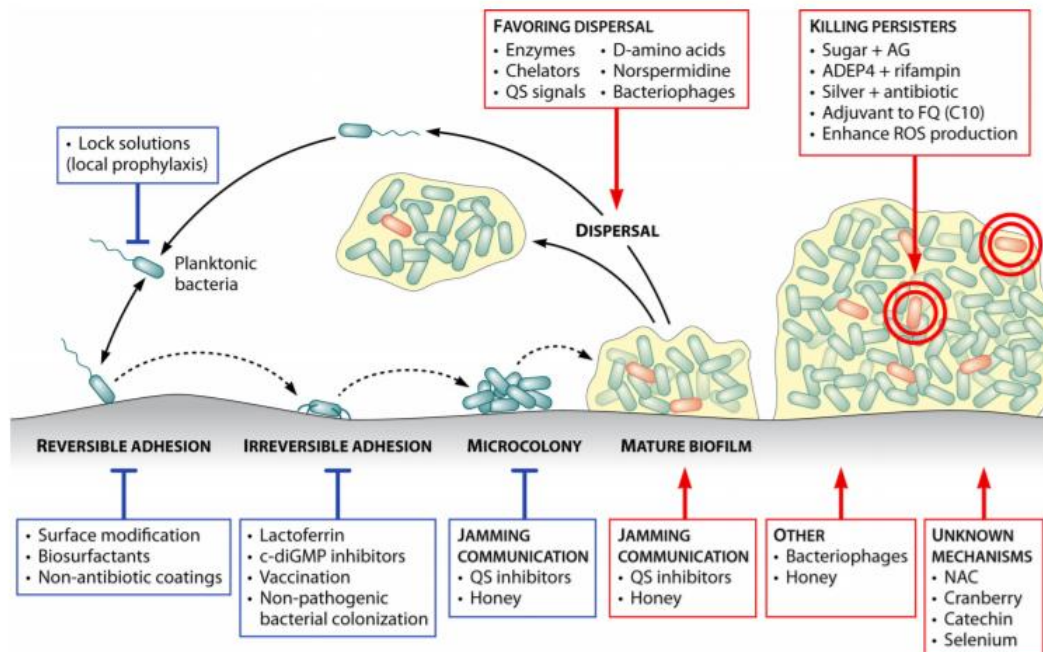


Figura 5. Principales estrategias para la prevención y erradicación de las biopelículas. Imagen obtenida de Lebeaux, D. "Biofilm-related infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance towards Antibiotics". (2014) (30).

3.6.2. Terapias basadas en fagos, uso de nanopartículas e inhibición del sistema de "quorum sensing".

Los fagos, o virus bacterianos, se consideran una gran alternativa a los antimicrobianos para infecciones bacterianas, especialmente para infecciones asociadas al biofilm (105). El uso de fagos tiene varias ventajas frente al uso de antimicrobianos químicos. Los fagos son muy abundantes y fácilmente de aislar de diferentes ambientes, su producción es relativamente barata, y son activos frente a microorganismos multi-

resistentes (75, 105, 106). Además, son muy específicos a la hora de parasitar un hospedador, por lo que no alterarían la microbiota normal humana y solo se replicarían en el lugar de infección por lo que, actualmente, no se han descrito efectos adversos (75, 105). Sin embargo, las terapias con fagos son bastante complejas y, aunque existen estudios demostrando su potente acción anti-biofilm, la erradicación completa de estas estructuras todavía sigue siendo un reto (105, 107-111). Teóricamente, la infección de las células sésiles de un biofilm debería ser rápida debido a su gran proximidad en comparación con las células planctónicas, pero las características de las propias biopelículas dificultan esta infección (106). Además, otra de las limitaciones para el uso de fagos, es la reducida actividad metabólica que presentan las células en estado sésil (106, 111). La replicación de los fagos dentro de la célula huésped depende fuerte y directamente del crecimiento celular (106). De esta forma, las células en el biofilm, sobre todo las que se encuentran en capas más internas, tienen un crecimiento muy ralentizado debido a la falta de oxígeno y de nutrientes, siendo menos susceptibles a ser lisadas por estos virus (111).

Otra de las estrategias de erradicación del biofilm es el uso de nanopartículas. Las principales nanopartículas usadas en estudios de agentes anti-biofilm son partículas metálicas, cuyo tamaño no sobrepasa los 100 nm, y entre las que destacan las nanopartículas de plata y de oro por sus propiedades antimicrobianas intrínsecas (75, 112). Estas partículas están cargadas positivamente de manera que se produce una fuerza de atracción con las membranas cargadas negativamente de las bacterias favoreciendo la penetración de la partícula al biofilm y aumentando la actividad antimicrobiana (75). Aunque los resultados *in vitro* son prometedores (113, 114), todavía existen escasos estudios *in vivo* de su actividad (115).

Finalmente, la interferencia con el sistema de “quorum sensing” bacteriano, ha resultado ser muy útil en la disrupción del biofilm en estudios *in vitro*, tanto en la eliminación del biofilm como la manipulación de su dispersión (116, 117). El sistema de “quorum sensing” es un proceso por el cual las bacterias producen y detectan moléculas de señalización coordinando su comportamiento con células cercanas (118, 119). Es un sistema que depende de la densidad celular y existen tres principales sistemas de “quorum sensing”: el sistema de la acilhomoserina lactona (AHL) en bacterias Gram-negativas, el sistema de autoinducción peptídico (AIP) en bacterias Gram-positivas, y el sistema autoinductor-2 en ambos tipos de bacterias (figura 6) (117-120).

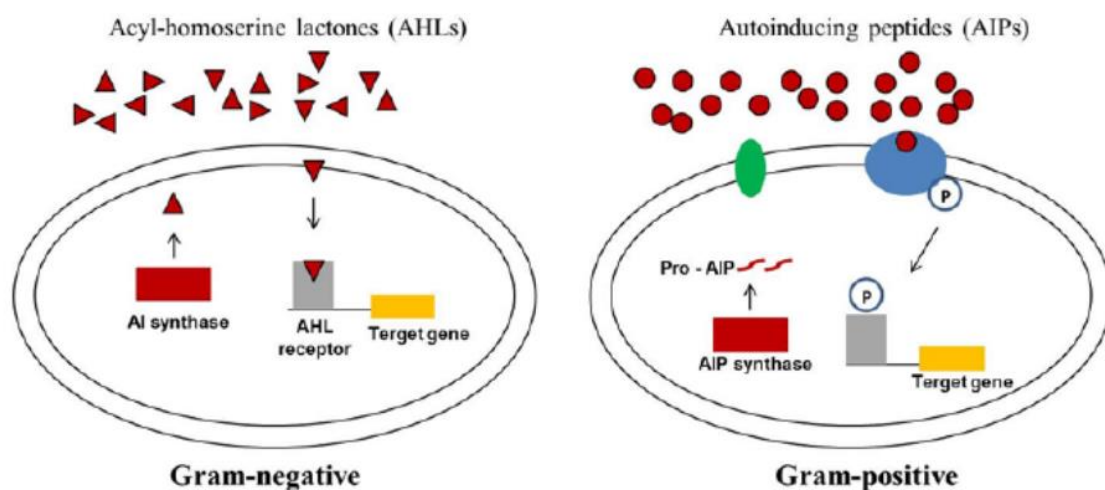
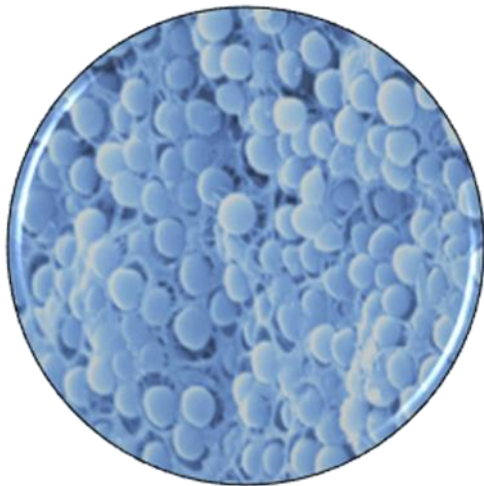


Figura 6. Sistemas de quorum sensing en bacterias gram-negativas y gram-positivas.

La inhibición de este tipo de sistemas se puede conseguir mediante: la inhibición directa de la señal impidiendo la síntesis o promoviendo la degradación de la propia molécula señalizadora, la inhibición de la unión de la molécula señal con su receptor, y/o la inhibición de la cascada de transducción de la señal (118).

3.6.3. Agentes activadores de la cascada de señalización de c-di-GMP.

Debido a que los microorganismos en estado planctónico son más susceptibles a los tratamientos antibióticos, una de las estrategias más novedosas se basa en promover la dispersión del biofilm para conseguir células desprendidas que recuperen sus características planctónicas (75). El di-GMP cíclico es una molécula intracelular involucrada en la coordinación de la transición de células planctónicas a estado sésil y viceversa (121). De hecho, se ha demostrado que existe una relación entre la concentración intracelular de c-di-GMP y la formación de biofilm de tal manera que concentraciones altas de esta molécula señalizadora promueven la formación de biopelículas mientras que concentraciones bajas favorecen el estado planctónico de la bacteria (121, 122). Así, las principales estrategias de inhibición de la formación o dispersión del biofilm son: modulación de los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante la expresión una fosfodiesterasa exógena (enzima encargada de degradar el c-di-GMP), el uso de pequeñas moléculas que bloqueen los dominios activos de las enzimas encargadas de la síntesis de este dinucleótido o que favorezcan la actividad fosfodiesterasa, el uso de análogos estructurales de c-di-GMP que interfieran entre la unión de este compuesto con sus efectores, y la inhibición de la transducción de su cascada de señalización (123).



JUSTIFICACION

E HIPÓTESIS

La Infección nosocomial ocurre entre el 5-10% de todos los pacientes ingresados en una institución sanitaria, siendo la BRC y la NAVM las dos entidades más importantes, principalmente en pacientes ingresados en UCIs por su comorbilidad y mortalidad asociadas (4, 37, 124, 125). Las tasas más recientes de ambas entidades son aproximadamente de 1-2 episodios de BRC por cada 1.000 días de catéter y de 2-16 episodios de NAVM por cada 1.000 días de ventilación mecánica (47, 126). La principal causa de aparición de ambas infecciones viene dada por la facilidad de los microorganismos (colonizadores de la piel y de la flora oro-digestiva) de formar un biofilm sobre la superficie de los dispositivos. Se sabe que el biofilm es precursor de las infecciones hasta en más del 80% de los casos. El principal factor de virulencia asociado al biofilm se debe a la capacidad de los microorganismos de crear una ME que les confiere una resistencia frente a la acción del sistema inmunitario del huésped y frente a la acción de los antimicrobianos (127).

Dentro de los agentes etiológicos más comúnmente asociados a la BRC y a la NAVM por su facilidad de formar biofilm son los cocos gram positivos (*Staphylococci*, *Enterococci*), los bacilos gram-negativos multi-resistentes (como *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli*), y levaduras (*Candida* spp.) (27). Por lo tanto, se requiere una optimización de las herramientas para la prevención y el tratamiento de ambas entidades en base a esta capacidad de los microorganismos de formar el biofilm (18).

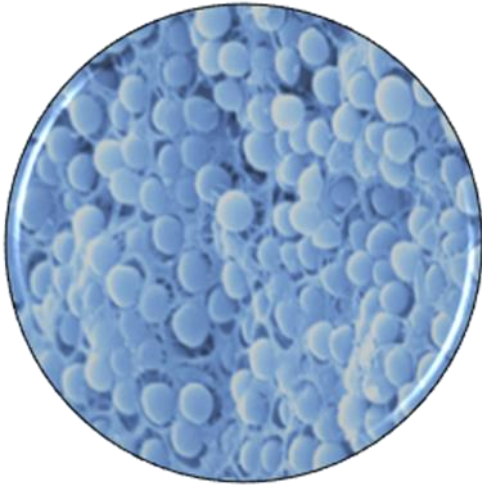
En la BRC, la terapia de sellado es la herramienta terapéutica más eficaz tanto en prevención como en tratamiento de aquellos catéteres que no pueden ser retirados. Diversos estudios han descrito la eficacia de antimicrobianos y antisépticos frente al biofilm bacteriano y fúngico (128, 129). Sin embargo, no hay datos consensuados sobre

el uso clínico de las terapias de cierre con antisépticos para el tratamiento de la BRC. Por lo que, la **primera hipótesis** del proyecto se fundamenta en determinar la solución de sellado de catéter basada en etanol con aquella la composición óptima para erradicar el biofilm de los principales microorganismos causantes de BRC y con mínimos efectos adversos.

Por otra parte, en cuanto a la NAVM, aunque se ha conseguido disminuir muy significativamente la incidencia mediante diferentes medidas de prevención, ésta ha permanecido estable a lo largo de los últimos años representando un gran problema para la salud de los pacientes, así como para las instituciones. Actualmente, como medida preventiva eficaz utilizada en algunas UCIs, sólo se dispone de una pasta oral y de una solución digestiva descontaminante, ambas compuestas de antibióticos y antifúngicos para erradicar la colonización de la cara interna del TET por flora oro-digestiva (130). Sin embargo, la aplicación de la SDD como medida adicional sobre la superficie externa del espacio subglótico (concepto de “terapia de sellado”) no ha sido aún descrita como posible medida de prevención de la NAVM en pacientes intubados durante más de 48 horas. Por tanto, la **segunda hipótesis** de este trabajo es la demostración *in vitro* de la eficacia de la SDD utilizada como “terapia de sellado” de la superficie externa del espacio subglótico en un modelo de simulación de intubación traqueal tanto para la prevención como para el tratamiento de la NAVM.

Por último, dado que el principal agente etiológico de la NAVM es *P. aeruginosa* (131) y debido a la alta frecuencia de cepas multi-resistentes, este microorganismo está cobrando una importancia muy significativa debido a la mortalidad que estas cepas llevan asociada (132). Puesto que esta bacteria tiene gran importancia en infecciones

tanto respiratorias como de otro origen, ciertos estudios mantienen que existe una relación entre un genotipo determinado y la localización de la enfermedad (p.e. fibrosis quística o infecciones urinarias) (133, 134). Sin embargo, no existe en la literatura ningún estudio en el cual se relacione un determinado perfil de virulencia basado en diferentes características feno-genotípicas de *P. aeruginosa* con la aparición de NAVM. Por todo ello, **la tercera y última hipótesis** de este proyecto es la posible relación entre un determinado perfil de virulencia de cepas clínicas de *P. aeruginosa* y la aparición de NAVM con la consiguiente optimización del diagnóstico rápido de este tipo de neumonía.



OBJETIVOS

✓ **Hipótesis 1.**

Una solución de sellado basada en etanol para el tratamiento de la BRC es capaz de reducir la actividad metabólica y el recrecimiento del biofilm de diversos microorganismos en un porcentaje lo suficientemente alto como para ser recomendada y usada como terapia de sellado.

OBJETIVO 1

Diseñar y validar en estudio *in vitro* una solución de sellado de catéter idónea para erradicar el biofilm de diversas bacterias y levaduras con mínima concentración de etanol y de anticoagulante capaz de evitar la inactivación de la capacidad anti-trombótica de anticoagulante.

1.1. Estandarizar una concentración y un régimen óptimos de etanol como solución de sellado de catéteres para la prevención y erradicación de biofilm.

1.2. Determinar la actividad de la heparina y la enoxaparina en combinación con etanol.

1.3. Evaluar de la capacidad de erradicación de la solución de sellado de etanol y heparina o enoxaparina en modelo *in vitro* de biofilm con cepas clínicas.

✓ **Hipótesis 2.**

El uso de la “terapia de sellado” con SDD sobre el espacio subglótico de TET es capaz de prevenir y reducir el biofilm maduro de los microorganismos más comúnmente causantes de NAVM en un modelo *in vitro* de simulación de intubación traqueal.

OBJETIVO 2

Estudiar la eficacia de la solución digestiva descontaminante como “terapia de sellado” en el espacio subglótico del tubo endotraqueal, comparando la viabilidad de diversas bacterias y la composición de su biofilm mediante tres técnicas diagnósticas *in vitro*.

2.1. Evaluar *in vitro* la capacidad de erradicación de una “solución de sellado” de SDD sobre biofilms maduros de diferentes microorganismos en TET.

2.2. Evaluar *in vitro* la actividad anti-biofilm como medida de profilaxis frente a diferentes microorganismos en TET.

2.3. Evaluar la filtración de la SDD a través del tubo endotraqueal en el modelo *in vitro*.

✓ **Hipótesis 3.**

Podría existir una relación entre un determinado perfil de virulencia de cepas de *P. aeruginosa* y la aparición de NAVM.

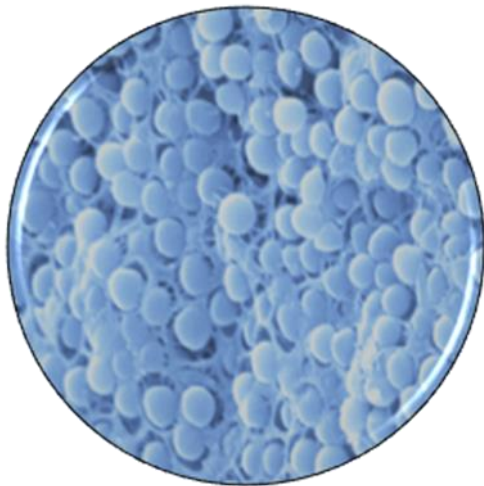
OBJETIVO 3

Realizar un estudio caso-control de caracterización de cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras del tracto respiratorio inferior de pacientes con NAVM (casos) y de muestras de otras localizaciones no invasivas (controles) para determinar si existe una asociación entre un determinado perfil de virulencia y la aparición de NAVM que permita obtener nuevos biomarcadores que puedan ser usados en el diagnóstico rápido de esta infección.

3.1. Determinar el grado de producción de biofilm en modelo estático de placas multi-pocillo por cristal violeta y XTT, el aspecto mucoso de las colonias y la producción de piocianina o pioverdina.

3.2. Caracterizar por PCR la presencia o ausencia de los genes *Apr*, *plcH*, *LasB*, *LasI*, *LasR*, *rhII*, *rhIR*, *ExoS*, *ExoU*, *ExoT*, *ExoY*, *AlgD*, *plcN* y *AlgU*.

3.3. Determinar el grado de patogenicidad de las cepas en modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*.



MATERIALES Y

MÉTODOS

1. Descripción del hospital.

La mayoría de las cepas estudiadas provienen de pacientes hospitalizados en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. El hospital es un hospital público terciario, de 1550 camas, perteneciente al Servicio Madrileño de Salud, que atiende a una población de unos 700.000 habitantes, repartido en varios edificios. Es una institución destacable por su dotación tecnológica y su capacidad docente e investigadora, así como por la alta capacitación y cualificación de sus profesionales, siendo referencia nacional e internacional en varias especialidades.

2. Aislados clínicos estudiados.

2.1. Cepas ATCC.

Para el estudio de la optimización de la concentración de etanol como terapia de cierre se utilizaron las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Escherichia coli* ATCC25922, y la levadura *Candida albicans* ATCC14058.

Por otro lado, en el estudio de la profilaxis y tratamiento del biofilm sobre el TET se usaron las cepas de *S. aureus* ATCC29213 y *E. coli* ATCC25922, descritas previamente, así como la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442.

Finalmente, se usó la cepa de *P. aeruginosa* PA01 como control positivo en los estudios de caracterización fenotípica de cepas de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con NAVM y de otros orígenes.

2.2. Cepas de origen en el catéter.

Se usaron un total de 100 cepas causantes de BRC donde 20 fueron de *S. aureus* (10 SASM y 10 SARM), 20 cepas de *E. coli*, 20 cepas de *Enterococcus* sp. (10 *E. faecalis* y 10 *E. faecium*), 20 cepas de ECN (10 *S. epidermidis* y 10 de otro tipo de ECN), y 20 cepas de *C. albicans*.

2.3. Cepas de *P. aeruginosa* de origen respiratorio causantes de NAVM y de otros orígenes.

Se incluyeron retrospectivamente 21 cepas de TRI (casos) de pacientes ingresados en los servicios de anestesia, reanimación, y medicina interna con NAVM clínica y microbiológicamente diagnosticada en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Por otra parte, las 50 cepas control se recogieron de orígenes diferentes a infecciones respiratorias y no invasivas: heridas, orina, hemocultivos, líquido cefalorraquídeo, exudados rectales, catéteres, nefrostomías, absesos, prótesis articulares y muestras de corneas.

2.4. Cepas provenientes de otros hospitales.

Para el estudio de caracterización feno-genotípica de cepas de *P. aeruginosa* se colaboró con otros hospitales tanto nacionales como internacionales. De esta forma, el Instituto San Gallicano de Roma nos cedió 15 cepas provenientes de úlceras, orinas, heridas, CVCs y hemocultivos; y 4 cepas recogidas de bronco-aspirados de pacientes con NAVM. Por otra parte, el Hospital Universitario de La Paz de Madrid contribuyó con una cepa de NAVM. El Hospital Ramón y Cajal de Madrid nos proporcionó 3 cepas de pacientes intubados con NAVM y el Hospital Clinic de Barcelona otras 11 cepas más.

3. Formación de biopelículas en placa multi-pocillo.

La formación de biofilms en placa de 96 pocillos se llevó a cabo según describieron Peeters y cols. con algunas modificaciones (135). Para ello, a partir de un cultivo en agar sangre de 24 horas de la cepa de estudio, se inoculó lo equivalente a un asa de siembra en 20 ml del medio correspondiente para cada microorganismo (**tabla 8**) y se incubó a 30°C durante una noche en un agitador orbital a 160 rpm.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS (uno de 20 ml y dos de 10 ml) en 4 ciclos de centrifugación-resuspensión a 3.500 rpm durante 5 minutos y vórtex vigoroso. Las células ya lavadas se resuspendieron en 10 ml de medio correspondiente (**tabla 8**). Esta solución se ajustó a 0,5 McFarland (10^8 ufc/ml) para bacterias y a 0,35 (10^6 ufc/ml) para levaduras, usando un nefelómetro (Dinko Instruments, España). Se inocularon 100 μ l de cada suspensión en las placas de 96 pocillos, usando como control negativo medio sin células, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células planctónicas se eliminaron tras 3 lavados con 100 μ l de PBS y las placas se dejaron secar boca abajo.

En el estudio de la optimización de la concentración de etanol como terapia de sellado, en combinación con heparina o enoxaparina, cada cepa se testó 6 veces. Para el estudio de la eficacia del etanol sobre cepas clínicas de BRC y en el estudio de la capacidad de *P. aeruginosa* para formar biofilm, cada cepa se testó en triplicados.

Tabla 8. Medios de cultivos utilizados para la formación de biopelículas en el inóculo y en el ajuste de McFarland.

Microorganismo	Medio del inóculo	Medio de McFarland
<i>S. aureus</i>	TSB	TSB
<i>S. epidermidis</i> (ECN) y <i>Enterococcus</i> sp.	TSB + 1% glucosa (p/p)	TSB + 1% glucosa (p/p)
<i>E. coli</i>	LB	LB
<i>P. aeruginosa</i>	BHI	BHI
<i>C. albicans</i>	YPD	RPMI 1640

3.1. Revelado de las placas para la cuantificación de la producción de biomasa mediante tinción por cristal violeta.

Una vez las placas estuvieron completamente secas, se añadieron 200 μ l de metanol al 99% y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Tras descartar el metanol, se añadieron 125 μ l de CV en cada pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente de 10-15 minutos. Se descartó el CV y se realizaron lavados con agua para eliminar completamente el CV sobrante. Para la solubilización del CV, se añadieron 125 μ l de ácido acético al 30% y se dejó incubar durante 10-15 minutos. Finalmente, se traspasaron los 125 μ l a una placa multi-pocillo limpia y se midió la absorbancia a 550 nm mediante un espectrofotómetro (Biochrom EZ Read 400).

3.2. Revelado de las placas para la cuantificación de la actividad metabólica mediante el uso de sales de tetrazolio (XTT).

Tras el secado de las placas, se añadieron 100 μ l de XTT (0,5 mg/ml) previamente mezclado con un 1 μ l de menadiona (1,72 mg/ml) para todos los estudios de cuantificación de la actividad metabólica, salvo para el estudio de la eficacia de sellado

con etanol, que se usaron 40 μ l. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se traspasaron los 100 μ l a una placa limpia donde se leyó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (Biochrom EZ Read 400).

3.3. Clasificación de las cepas en función de su capacidad de formar biofilm por CV o XTT.

La capacidad de formación de biofilm tanto por CV como por XTT se clasificó siguiendo los criterios descritos por Stepanovic y cols. (136). Así, todas las cepas se consideraron baja, moderada, o altamente formadoras de biofilm de la siguiente manera:

- **Bajamente formadoras** $\rightarrow DO < 2DO_c$
- **Moderadamente formadoras** $\rightarrow 2DO_c \leq DO < 4DO_c$
- **Altamente formadoras** $\rightarrow 4DO_c \leq DO$

Donde DO es la densidad óptica de la cepa en estudio y DO_c es la media de la absorbancia del control negativo más 3 veces la desviación estándar.

4. Sellado con etanol *in vitro* y capacidad de recrecimiento.

4.1. Tratamiento con etanol.

4.1.1. Tratamiento de etanol y heparina frente a cepas ATCC.

Sobre un biofilm de 24 horas de *S. aureus* ATCC29213, *S. epidermidis* (cepa clínica), *E. faecalis* ATCC33186, *E. coli* ATCC25912 y *C. albicans* ATCC14058, se testaron 3 concentraciones diferentes de etanol (25%, 40%, y 70%) tanto solo como combinado con 60 UI de heparina (heparin sodium, 5,000 UI/5ml, Hospira Prod Farm y Hosp, S.L.),

siendo esta concentración la práctica estándar de nuestra institución en el uso clínico de sellado. Los regímenes de tratamiento fueron: dosis única de 2 horas, 24 horas, y 72 horas; y 2 horas durante 3 días (2 horas de terapia seguidas de 22 horas de medio); 2 horas durante 7 días; y 24 horas durante 7 días seguidos. Todas las placas se incubaron a 37°C hasta el final del tratamiento.

El volumen final de cada pocillo fue de 240 μ l (120 μ l de la solución de etanol + 120 μ l de medio) en el caso de los biofilms tratados, y de 120 μ l de medio en los controles positivos y negativos.

Todos los experimentos se realizaron en réplicas de 6 con recambio del medio de cultivo o de las soluciones alcohólicas cada 24 horas. En la **figura 7** se muestra el procedimiento para la optimización de la concentración de etanol combinado con heparina en cepas ATCC.

4.1.2. Tratamiento de etanol con enoxaparina en cepas ATCC.

Las biopelículas preformadas de 24 horas de las cepas descritas previamente se expusieron a soluciones de etanol al 30%, 35%, y 40% tanto solas como combinadas con 60 UI de enoxaparina (Clexane 40mg, 4000UI, enoxaparina sódica, Sanofi-Aventis, SA., Barcelona, España). Los tiempos de tratamiento fueron dosis única de 2 horas y de 24 horas.

4.1.3. Tratamiento con etanol y heparina en cepas clínicas.

Se usaron 100 cepas clínicas causantes de BRC como se ha explicado anteriormente. Tras formar un biofilm de 24 horas, se trataron con una solución de sellado de etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina durante 72 horas con recambio del sellado cada

24 horas y siguiendo el protocolo usado para las cepas ATCC. Todas las cepas y los controles se testaron en triplicados. Se eligió únicamente esta terapia, tras haber demostrado que fue la más eficaz de todas las testadas previamente con las cepas ATCC.

4.1.4. Cálculo de la reducción de la biomasa y de la actividad metabólica tras el tratamiento.

Tras finalizar los tratamientos, las placas se lavaron 3 veces con 240 μ l de PBS (en caso de las biopelículas tratadas) o con 120 μ l de PBS (en caso de los controles) y se dejaron secar. Una vez las placas estuvieron completamente secas, se llevó a cabo el ensayo del XTT. En el caso de las cepas clínicas de BRC adicionalmente a la actividad metabólica, también se evaluó la cantidad de biomasa mediante CV. La reducción de la actividad metabólica/biomasa se calculó siguiendo la **ecuación 1**.

$$\% \text{ reducción actividad metabólica/biomasa} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{492/550} \text{ de la cepa tratada}}{\text{Abs}_{492/550} \text{ del control positivo}} \right) * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de reducción de la actividad metabólica o de la biomasa de las biopelículas tras la terapia de sellado con etanol.

Se consideró como exitoso aquel tratamiento que alcanzó, al menos, una reducción del 90%, en el caso de las cepas ATCC, y del 85% en el caso de las cepas clínicas.

4.2. Capacidad de recrecimiento.

La inhibición del recrecimiento se estudió solo con la menor concentración de etanol posible capaz de reducir, al menos, un 90% la actividad metabólica. El etanol sólo se usó para terapias de 2 horas, y combinado con heparina para terapias de ≥ 24 horas. Los tiempos de sellado fueron los mismos que en el caso de la reducción de la actividad metabólica, y el recrecimiento se midió 24 horas y 7 días después de las terapias, con

recambio de medio cada 24 horas. Para ello, tras finalizar las terapias, se añadieron 100 μ l de medio correspondiente y las placas se incubaron a 37 °C.

En el estudio de la capacidad de recrecimiento de las cepas clínicas causantes de BRC, solo se usó etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina con un tiempo de sellado de 72 horas y 24 horas y 3 días de recrecimiento, ya que fue la combinación más eficaz en los estudios previos.

Todas las cepas se testaron en 24 repeticiones. Al concluir los ensayos, se traspararon 100 μ l de medio a una placa multi-pocillo limpia y se leyó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (Biochrom EZ Read 400). La inhibición del recrecimiento se calculó a las 24 horas y los 7 días tras el tratamiento usando la **ecuación 2**.

$$\% \text{ inhibición del recrecimiento} = \left(\frac{Abs_{492} \text{ control positivo} - Abs_{492} \text{ cepa tratada}}{Abs_{492} \text{ control positivo}} \right) * 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición del recrecimiento tras la terapia con etanol.

4.3. Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como la media (DE) del porcentaje de reducción tanto de la actividad metabólica y biomasa como de la inhibición del recrecimiento. Las diferencias entre cada grupo de terapia se compararon usando el test ANOVA y los tests post-hoc de Dunnett y Games-Howell

En el estudio de la eficacia de sellado de etanol combinado con enoxaparina las variables cuantitativas se expresaron como la media (DE) y se usó el test de Kruskal-Wallis, con una corrección de Bonferroni, para comparar las diferencias entre grupos.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue <0,05 para todos los test. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

5. Actividad de la heparina.

La actividad de la heparina se analizó mediante el ensayo de Anti-Xa. Se recogió un pool de plasma de pacientes con valores de coagulación normales y se congeló a -80°C. Las soluciones alcohólicas al 25%, 40%, y 70% se mezclaron con 60 UI de heparina y se incubaron a 37°C durante 2 horas, 24 horas y 72 horas.

El plasma se dejó descongelar a temperatura ambiente y se añadió 1 ml a cada solución en el momento del análisis. Como control se usó una solución formada solo por 60 UI de heparina y agua.

Estas soluciones se introdujeron en un sistema automatizado donde se añadió el reactivo anti-Xa (*HemosIL[®] Liquid Anti-Xa*) y se midió la absorbancia a 405 nm. Todos los resultados se expresaron como UI/ml de heparina libre.

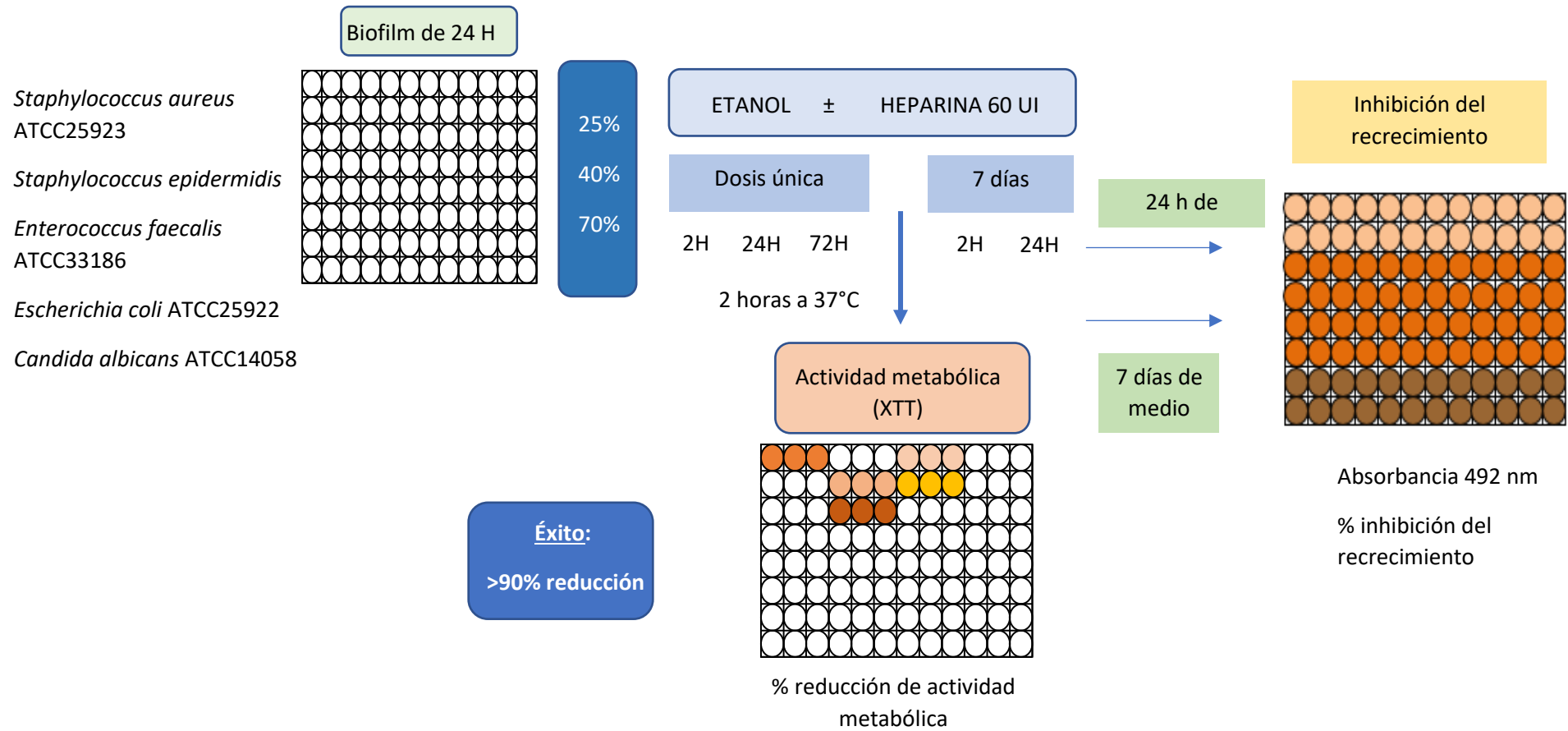


Figura 7. Procedimiento para la optimización de la concentración de etanol como terapia de sellado tanto solo como combinado con heparina en un modelo *in vitro* en cepas ATCC.

6. Profilaxis y tratamiento de NAVM sobre modelo *in vitro*.

6.1. Modelo *in vitro* de NAVM.

Se utilizó un modelo *in vitro* de simulación de intubación traqueal en adultos utilizando TET con neumotaponamiento (TaperGuard Oral Tracheal Tube Evac Murphy Eye, Mallinckrodt™) (**Figura 8**)(137). Para ello se introdujeron los TET en jeringas de 20 ml sin émbolo (simulando la tráquea), sujetas a su vez dentro de un tubo Falcon (para recoger cualquier posible filtración a través del manguito del neumotaponamiento). Finalmente se hincharon los manguitos.

6.2. Terapia de profilaxis.

El espacio subglótico se colonizó simultáneamente en los tubos de terapia y controles negativos con 1,5 ml de una solución de 0,5 McFarland de la cepa de estudio (*P. aeruginosa* ATCC15442, o *E. coli* ATCC25922, o *S. aureus* ATCC29213) y 1,5 ml de la SDD (2,6 mUI de nistatina, 15,6 mg/ml de tobramicina, y 13 mg/ml de colimicina; en caso de *S. aureus* también se añadió adicionalmente vancomicina 3,6 mg/ml). En caso de los tubos de controles positivos se añadió únicamente 1,5 ml de NaCl (0,9%).

Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las soluciones se desecharon y los tubos se lavaron con suero salino estéril y se incubaron con medio durante 22 horas a 37°C. Este proceso se repitió durante 5 días y todas las muestras se testaron en réplicas de 6.

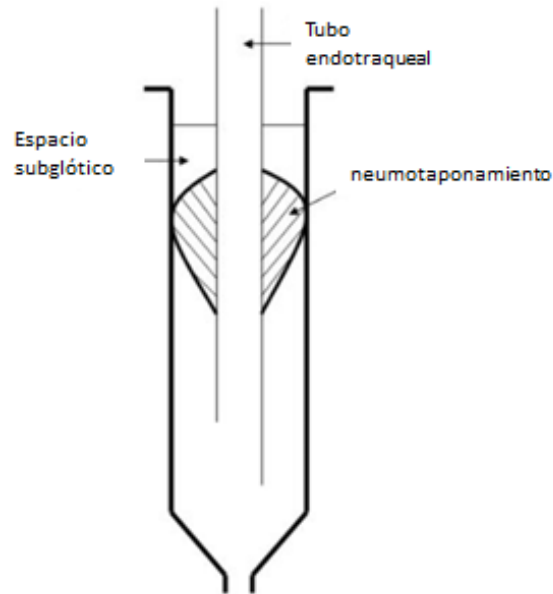


Figura 8. Esquema del modelo *in vitro* de intubación simulando la tráquea de un adulto.

6.3. Terapia de tratamiento.

6.3.1. Formación del biofilm sobre TET.

Se añadieron 3 ml de una solución 0,5 McFarland de la cepa de estudio (*P. aeruginosa* ATCCC15442, o *E. coli* ATCC25922, o *S. aureus* ATCC 29213) al espacio subglótico de cada tubo. En caso de los tubos de controles negativos se añadió únicamente medio de cultivo. Los tubos se incubaron a 37°C durante 72 horas con recambio de medio cada 24 horas.

6.3.2. “Terapia de sellado”.

Una vez formada la biopelícula, los tubos se lavaron con suero salino. La “terapia de sellado” se basó en una aplicación de 3 ml de SDD sobre el biofilm maduro, en caso de los tubos tratados y los controles negativos, y de 3 ml de suero salino estéril, en caso de los controles positivos, durante un total de 2 horas. Tras el tratamiento, todas las

soluciones se retiraron y los tubos se lavaron con suero salino y se incubaron con medio a 37°C durante 22 horas. Este protocolo se repitió durante 5 días consecutivos. Todas las muestras se testaron en réplicas de 6.

6.4. Procesamiento de los tubos.

Todos los tubos se lavaron con suero salino estéril antes del análisis.

Cada TET se cortó con tijeras estériles en 3 segmentos de aproximadamente 0,5 cm cada uno. Cada segmento se analizó de una forma diferente (**Figura 9**).

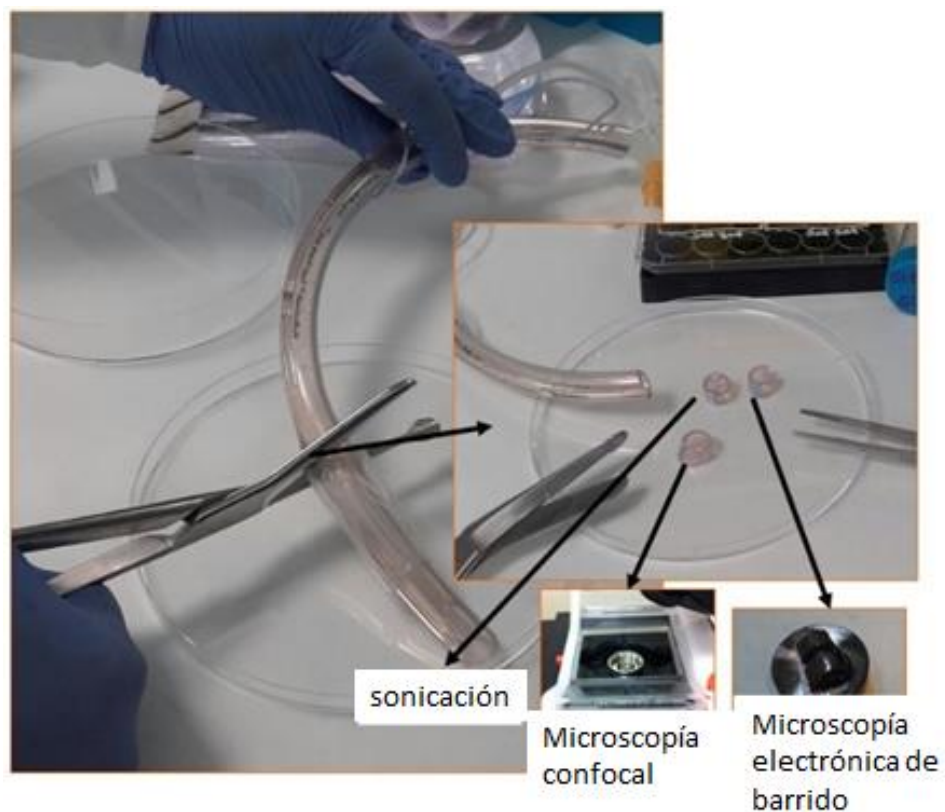


Figura 9. Procesamiento y análisis de los TET tras las terapias de profilaxis o tratamiento con SDD.

6.4.1. Recuento de unidades formadores de colonias y porcentaje de células vivas.

El primer fragmento se sonicó en 2 ml de PBS durante 1 minuto a 50 Hz y se vortéó vigorosamente. Se realizaron 4 diluciones seriadas 1:100 y se sembraron 100 μ l de cada dilución en placas de agar sangre para posterior incubación a 37°C durante 24 horas. Paralelamente se evaluó si el raspado del tubo proporcionaba mejores resultados que la sonicación. Para ello, se rascaron los tubos de los controles positivos con una torunda estéril y se introdujo en un 1 ml de PBS. Se cultivaron 100 μ l de esta solución en agar sangre durante 24 horas a 37°C. Las unidades formadoras de colonias (ufc) se expresaron como el número de ufc/ml con un límite de detección de ≤ 10 ufc/ml.

El análisis células vivas y muertas se realizó mediante la centrifugación del sonocado sobrante para evaluar la viabilidad de las bacterias. El pellet se resuspendió en 50 μ l de suero salino y se tiñó con Live/Dead® Baclight kit™ (0,5 μ l de SYTO9®, stock 3,34 mM en DMSO; y 0,5 μ l de yoduro de propidio, stock 20 mM en DMSO) (Baclight kit™; Invitrogen, Barcelona, España) durante 15 minutos y protegido de la luz (138). Una gota (5 μ l) de cada dilución se extendió en un porta-objetos y se visualizó con microscopía confocal en un microscopio confocal invertido de fluorescencia (SPE, Leica Microsystems) equipado con los objetivos ACS APO 10X/0,3 y ACS APO 63X/1,3. Las imágenes se tomaron con este último objetivo. De cada muestra se tomaron tres imágenes diferentes que contuvieran aproximadamente 1.000 células. La cuantificación de las células vivas y muertas se realizó usando el programa informático FIJI software (National Institute of Health, US). Los porcentajes de bacterias vivas se calcularon mediante el ratio entre el número de células vivas y el total de células en la muestra multiplicándolo por 100.

6.4.2. Visualización de la biomasa de la biopelícula.

El segundo fragmento del tubo se fijó congelándolo a -80°C durante 72 horas. Se dejó descongelar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se tiñó con Live/Dead® BacLight kit™ (1,5 μl de SYTO9®, stock 3,34 mM en DMSO; y 1,5 μl de yoduro de propidio, stock 20 mM en DMSO, disueltos en 1 ml de PBS) (BacLight kit™; Invitrogen, Barcelona, España) durante 15 minutos protegido de la luz (138). Las muestras se visualizaron usando el microscopio confocal de fluorescencia con el objetivo ACS APO 10X/0,3. Las imágenes se editaron usando el programa FIJI software (National Institute of Health, US).

6.4.3. Visualización de la estructura de la biopelícula.

El tercer fragmento se utilizó para visualizar la estructura del biofilm usando microscopía de barrido en el Centro Nacional de Microscopía de Barrido (CNMB-ICTS) de la Universidad Complutense de Madrid. El segmento se introdujo en glutaraldehído al 2% durante 3 días y, tras una deshidratación con alcohol a concentraciones crecientes, las muestras se tiñeron con átomos de oro. La estructura de las biopelículas tanto tratadas como sin tratar se visualizaron usando un microscopio de barrido electrónico (JEOL-JSM 6400).

6.5. Test de filtración.

Para evaluar si “la terapia de sellado” en el TET pudiera ser peligroso para los pacientes debido a una filtración de la SDD a través del neumo-taponamiento pudiendo llegar a los pulmones, nuestro modelo *in vitro* se introdujo en un tubo Falcon para poder recoger cualquier filtración que se produjera durante las terapias.

6.6. Análisis estadístico.

Las variables cualitativas aparecen con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se expresaron mediante la mediana y el RIQ. Las variables continuas no normales se compararon usando los tests de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Todos los test estadísticos fueron de dos colas y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue $<0,05$ para todos los test. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

7. Caracterización feno-genotípica de cepas de *P. aeruginosa*.

7.1. Determinar el grado de producción de biofilm en modelo estático de placas multi-pocillo por cristal violeta y XTT, el aspecto mucoso de las colonias y la producción de pioverdina o piocianina.

Todas las biopelículas se evaluaron según lo descrito en el punto 3. El aspecto mucoso de las colonias se determinó de forma visual tras sembrar las cepas en agar Mc Conkey e incubarlas a 37°C durante 24 horas (**figura 10**).

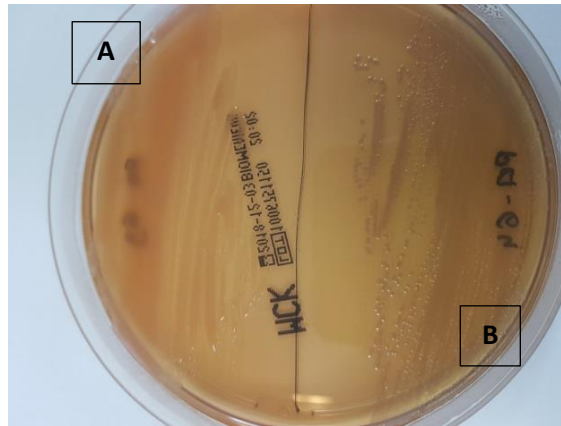


Figura 10. Diferencia visual entre colonias de *P. aeruginosa* mucosas (A) y no mucosas (B) en agar Mc Conkey.

La producción de pioverdina o piocianina se realizó de forma visual tras cultivo en placas de Cetrimide (Pseudosel Agar, BD). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideraron cepas productoras de pioverdina aquellas que tenían un color verde fluorescente o marrón amarillento, y, productoras de piocianina aquellas con color azulado o verde oscuro (139) (figura 11).

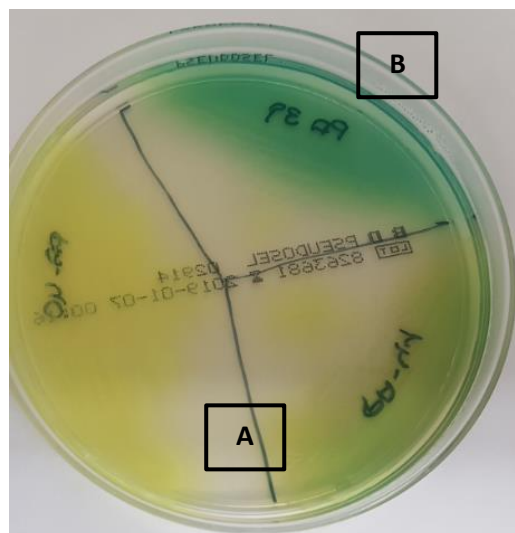


Figura 11. Cepas de *P. aeruginosa* productoras de pioverdina (A) o piocianina (B).

7.2. Caracterización molecular por PCR de los genes *Apr*, *plcH*, *LasB*, *LasI*, *LasR*, *rhII*, *rhIR*, *ExoS*, *ExoU*, *ExoT*, *ExoY*, *AlgD*, *plcN* y *AlgU*.

7.2.1. Extracción de ADN bacteriano.

Todas las extracciones de ADN se realizaron usando el kit de extracción de QIAamp® DNA Mini Kit (250) (QIAGEN). Para ello, se recogió una colonia de un cultivo fresco de 24 horas y se introdujo en 180 µl del reactivo ATL mezclado con 20 µl de proteinasa K y se incubó a 56°C durante 10 minutos en agitación. Se añadieron 200 µl de reactivo AL, se vorteoó vigorosamente y se incubó a 70°C durante otros 10 minutos. Se dejó enfriar, se añadieron 200 µl y se vorteoó. Se traspasó todo el volumen a la columna de elución y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Se decantó la solución y se añadieron 500 µl de AW1. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto y se volvió a descartar la solución. Se añadieron 500 µl y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. Se descartó la solución y se volvió a centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Se cambiaron los tubos de elución, se añadieron 100 µl de reactivo AE y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Las muestras de ADN extraído se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

7.2.2. Presencia o ausencia de genes de virulencia.

Para la determinación de presencia o ausencia de genes de virulencia, más comúnmente descritos en la bibliografía, de cepas de *P. aeruginosa* se usó la técnica de PCR convencional. Todos los genes, excepto *AlgU* y *ExoU*, se determinaron mediante PCR múltiple. Para ello se usó un volumen de reacción final de 50 µl donde 25 µl fueron de un máster mix comercial ya preparado (Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix, Thermofisher Scientific™), 20 µl fueron de agua estéril libre de ARnasas y oligos (**tabla**

9) (0,3 μM , excepto rhIR y rhIR cuya concentración fue de 0,9 μM), y 5 μl de ADN molde. Los oligonucleótidos para la detección de ExoU se diseñaron durante este estudio usando el programa online Primer-BLAST del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). Las PCR se realizaron en un termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied biosystems) y todas las condiciones se muestran en la **tabla 10**. En el caso de los genes AlgU y ExoU, se realizó una PCR simple para cada gen siguiendo las condiciones de la **tabla 10**.

Todas las reacciones se realizaron con un control positivo (*P. aeruginosa* PA01) y un control negativo (en el cual los 5 μl de ADN se sustituyeron por 5 μl de agua estéril libre de ARNasas). En el caso del gen *ExoU* como control positivo se utilizó PA14 generosamente cedida por el laboratorio del Dr. A. Torres (Mallorca).

Tabla 9. Genes y secuencias de los primers para cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Gen	Primer	Secuencia	Referencia
AlgD	Forward	5'-AAGGCGGAAATGCCATCTCC-3'	(140)
	Reverse	5'-AGGGAAGTTCCGGGCGTTTG-3'	
AlgU	Forward	5'-CGCGAACCGCACCATCGCTC-3'	(140)
	Reverse	5'-GCCGCACGTACGAGC-3'	
LasB	Forward	5' GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC 3'	(140)
	Reverse	5'-TGGCGTCGACGAACACCTCG-3'	
PlcH	Forward	5'-GCACGTGGTCATCCTGATGC-3'	(140)
	Reverse	5'-TCCGTAGGCGTCGACGTAC-3'	
PlcN	Forward	5'-TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG-3'	(140)
	Reverse	5'-TCGCTGTGCGAGCAGGTGGAAC-3'	
ExoS	Forward	5'-CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG-3'	(140)
	Reverse	5'-CCGAACCGCTTCACCAGGC-3'	
ExoT	Forward	5'-CAATCATCTCAGCAGAACCC-3'	(140)
	Reverse	5'-TGTCGTAGAGGATCTCCTG-3'	
ExoY	Forward	5'-TATCGACGGTCATCGTCAGGT-3'	(140)
	Reverse	5'-TTGATGCACTCGACCAGCAAG-3'	
ExoU	Forward	5'-TACCAGGTACGGCCATGTTC-3'	(140)
	Reverse	5'-ACGCTCTGAAGCCTGAAGAC-3'	
Apr	Forward	5'-TGTCCAGCAATTCTTTGC-3'	(140)
	Reverse	5'-CGTTTTCCACGGTGACC-3'	
LasI	Forward	5' CGTGCTCAAGTGTTCAAGG 3'	(134)
	Reverse	5' TACAGTCGGAAAAGCCCAG 3'	
LasR	Forward	5' AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG 3'	(134)
	Reverse	5' GTAGTTGCCGACGACGATGAAG 3'	
rhII	Forward	5' TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC 3'	(134)
	Reverse	5' TTCCAGCGATTCAGAGAGC 3'	
rhIR	Forward	5' TGCATTTTATCGATCAGGGC 3'	(134)
	Reverse	5' CACTTCCTTTTCCAGGACG 3'	

Tabla 10. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para las diferentes reacciones.

Número de reacción	Genes	TA (°C)	Tamaño del amplicon (pb)
Reacción 1	<i>rhIR</i> <i>LasI</i> <i>Apr</i>	57	133 295 1017
Reacción 2	<i>ExoY</i> <i>AlgD</i> <i>plcH</i>	60	1035 290 608
Reacción 3	<i>ExoS</i> <i>LasB</i> <i>plcN</i> <i>LasR</i>	65	444 284 481 130
Reacción 4	<i>ExoT</i> <i>rhII</i>	57	1159 155
Reacción 5	<i>ExoU</i>	59	575
Reacción 6	<i>AlgU</i>	66	1500

TA, temperatura de anillamiento; pb, pares de bases.

Todas las PCR se realizaron siguiendo un primer paso de desnaturalización a 98°C durante 30s, seguido de 30 ciclos: 98°C durante 10s, TA, durante 30s y 72°C 30s, y un paso final de elongación a 72°C durante 10 min.

Finalmente, la visualización de los productos de amplificación se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 170 voltios, excepto para la amplificación de los genes *ExoS*, *plcN*, *LasB* y *LasR*, para los cuales el gel fue del 4%, durante 1 hora y media al mismo voltaje. GeneRuler 1 kb y 100 bp DNA ladders ready-to-use (Thermo Scientific™) se usaron para medir los fragmentos amplificados. Las imágenes se obtuvieron usando un transiluminador (UviTech, Cambridge).

La secuenciación de los fragmentos se realizó para corroborar que la amplificación se había realizado sobre los genes deseados. Para ello, los amplicones resultantes de la PCR se purificaron usando el kit QIAquick® PCR Purification Kit (250) (QIAGEN) siguiendo

las instrucciones del fabricante. Las secuencias *forward* se secuenciaron en el servicio de genómica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. Las secuencias se alinearon usando la base de datos BLAST para la identificación del gen.

7.3. Determinación del grado de patogenicidad en modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*.

Se emplearon larvas de *Galleria mellonella* en estadio larvario final (Bichosa, Salceda de Caselas, España) siguiendo el protocolo descrito por Benthall y cols. con algunas modificaciones (141). Las larvas se mantuvieron en virutas de madera y en oscuridad a 16°C hasta el momento de la infección. Para cada cepa de estudio se usaron 10 larvas con un peso similar (330 ± 20 mg). Como control se usaron otras 10 larvas con un inóculo de PBS para evaluar el daño del propio pinchazo. Todas las larvas se desinfectaron con etanol al 70% previamente a la infección. El inóculo se inyectó usando una jeringa Hamilton que se desinfectó con tres soluciones diferentes en el siguiente orden: lejía diluida al 10%, etanol al 70%, y PBS.

Las colonias de *P. aeruginosa* de un cultivo fresco se inocularon en 10 ml de BHI y se incubaron a 37°C en agitación durante la noche. Se realizaron dos lavados con 10 ml de PBS mediante 3 ciclos de centrifugación y resuspensión a 3.500 rpm durante 5 minutos y se ajustó la concentración a un 0,5 McFarland (10^8 ufc/ml) usando un nefelómetro (Dinko Instruments, España). El inóculo se ajustó a una concentración de 10^3 ufc/ml mediante diluciones seriadas y la infección se realizó mediante la inyección de 10 μ l del inóculo (10 ufc/larva) directamente en el hemocele a través de la última pro-pata izquierda (**figura 12**).

La muerte de las larvas se evaluó de forma visual y se consideraron como muertas aquellas larvas que no respondieron a estímulos mecánicos o completamente melanizadas (**figura 13**). La supervivencia larvaria se midió a partir de las 16 horas tras la infección y se evaluó hora tras hora hasta cumplir 24 horas tras el inóculo.



Figura 12. Infección de una larva de *G. mellonella* con una suspensión de *P. aeruginosa*. Imagen adaptada con el consentimiento de la Dra. Laura Marcos-Zambrano.

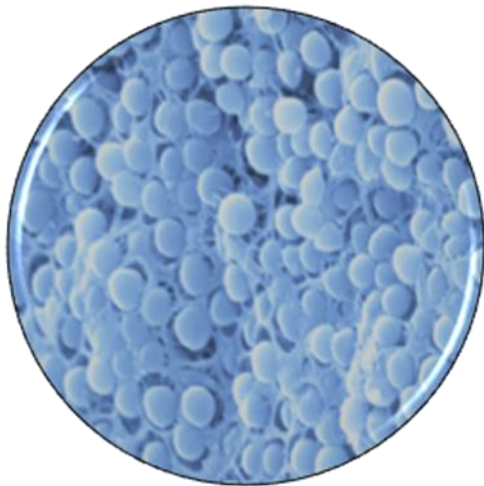


Figura 13. Larvas de *G. mellonellas* muertas tras la infección con *P. aeruginosa*. Las larvas de color negro muestran un gran grado de melanización.

7.4. Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas se expresaron como la media (DE) y las variables cualitativas se indicaron como porcentajes. Las variables categóricas se compararon usando el test de la Chi-Cuadrado mientras que las variables continuas se compararon usando el test t-student. La significancia estadística se estableció como $p < 0.05$. Todos los test se realizaron usando el programa estadístico SPSS 21.0 (IBM).

Las curvas de supervivencia se analizaron usando el método de Kaplan-Meier mediante el programa GraphPad Prism 5.02 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Las diferencias en la supervivencia se compararon usando el test de log-rank (Mantel-Cox). La significancia estadística se estableció para $p < 0.05$.



RESULTADOS

1. El etanol, tanto solo como combinado con anticoagulante como solución de sellado, es capaz de disminuir el biofilm, tanto bacteriano como fúngico, causante de BRC.

1.1. Optimización de la concentración y tiempo de tratamiento de etanol y heparina en cepas ATCC. Reducción de la actividad metabólica del biofilm tras la terapia de sellado con etanol y heparina.

Para evaluar la capacidad del etanol de erradicar la actividad metabólica del biofilm de cepas ATCC causantes de BRC, se usaron 3 concentraciones diferentes de etanol tanto solo como combinado con 60 UI de heparina. En general, las soluciones compuestas por etanol al 25%, aunque eficaces para algunas especies con tiempos de tratamiento mayores a 24 horas, mostraron una gran variabilidad dependiendo de la duración del tratamiento y de la combinación con la heparina. Por el contrario, todas las soluciones de etanol al 70% fueron eficaces en reducir $\geq 90\%$ la actividad metabólica de todos los microorganismos para todos los tiempos de tratamiento testados ($p < 0.05$).

Respecto a las soluciones de etanol al 40%, el etanol sin anticoagulante fue eficaz para todos los tiempos de tratamiento. Sin embargo, combinado con heparina solo fue eficaz para tiempos de tratamiento superiores a 24 horas (**figura 14**). Así, los valores más altos de reducción de la actividad metabólica se obtuvieron con la combinación de etanol al 40% y 60UI de heparina durante 24 y 72 horas, así como con todas las soluciones de etanol al 70% para todos los tiempos de tratamiento testados ($p = 0.08$).

A nivel de especie (**figura 15**), todas las soluciones de etanol al 70% redujeron $> 90\%$ la actividad metabólica del biofilm de todos los microorganismos en todos los regímenes. Usando las soluciones de etanol al 40%, los mejores valores de reducción de

actividad metabólica se obtuvieron para *E. coli*, con un porcentaje total de reducción del 99%, y los más bajos se observaron en *S. aureus* con un 91%. Cuando el etanol se combinó con heparina, el porcentaje total de reducción de actividad metabólica más alto se obtuvo en *S. epidermidis* (92,4%) y el más bajo en *C. albicans* (66,7%). Sin embargo, si en las combinaciones con heparina se eliminan los tratamientos de 2 horas, ya que el anticoagulante no sería necesario, estos porcentajes se ven aumentados y todas las especies alcanzaron al menos un 91% de reducción de actividad metabólica

Así, la concentración mínima de etanol eficaz en reducir al menos el 90% de la actividad metabólica del biofilm tanto bacteriano como fúngico fue 40%. Y, en cuanto a los tiempos óptimos, las mejores terapias fueron etanol solo al 40% durante 2 horas y, para terapias >2 horas, combinado con heparina, durante 72 horas.

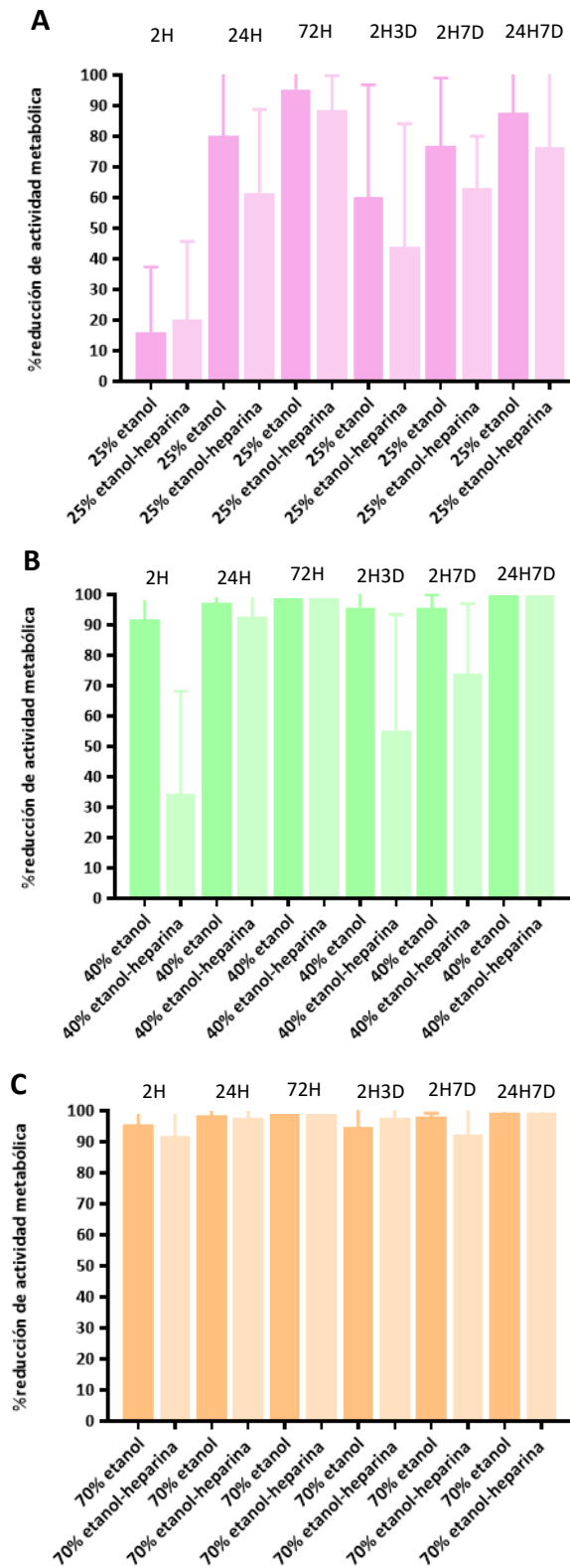


Figura 14. Porcentajes totales de reducción de actividad metabólica para todos los tiempos de tratamiento y las 3 concentraciones de etanol con y sin heparina. **A** 25% etanol. **B** 40% etanol. **C** 70% etanol. **2H**, 2 horas; **24H**, 24 horas; **72H**, 72 horas; **2H3D**, 2 horas durante 3 días; **2H7D**, 2 horas durante 7 días; **24H7D**, 24 horas durante 7 días.

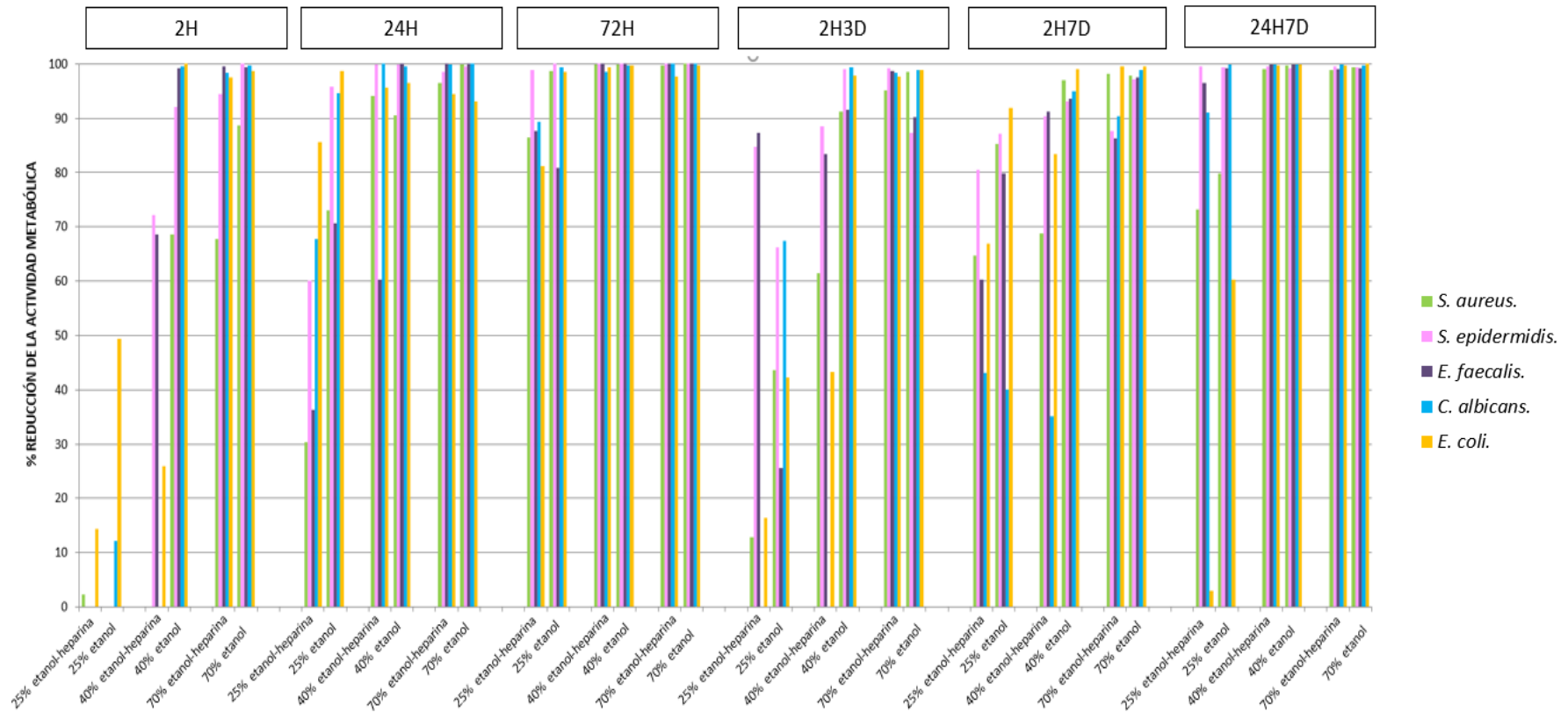


Figura 15. Porcentaje de reducción de actividad metabólica tras las terapias de sellado con etanol para un biofilm preformado de 24 horas de *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Candida albicans* ATCC14058, y *Escherichia coli* ATCC25922. **2H**, 2 horas; **24H**, 24 horas; **72H**, 72 horas; **2H3D**, 2 horas durante 3 días; **2H7D**, 2 horas durante 7 días; **24H7D**, 24 horas durante 7 días.

1.2. Inhibición del recrecimiento de las cepas tratadas con la solución de sellado de etanol y heparina.

Una vez elegida la solución de sellado con menor concentración de etanol posible (etanol al 40% en tratamientos de 2 horas, y combinado con heparina para tratamiento superiores a 24 horas), se evaluó la capacidad de las soluciones de etanol para inhibir el recrecimiento de las células sésiles presentes en los biofilms a las 24 horas y 7 días tras la exposición a la terapia.

En general, el porcentaje de inhibición del recrecimiento (IR) más alto se consiguió en las terapias de 72 horas y recrecimiento de 24 horas (77,5%). Sin embargo, las terapias en dosis únicas de 2 horas y 24 horas con recrecimientos de 24 horas no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la terapia de 3 días ($p > 0,05$). Estos porcentajes de inhibición disminuyen si las terapias con etanol son de 7 días consecutivos. Así, para recrecimientos de 24 horas los porcentajes de IR fueron de 57,8% para terapias de 2 horas durante 7 días, y de 65,7% para tratamientos de 24 horas durante 7 días consecutivos.

Respecto a los recrecimientos de 7 días, el porcentaje de inhibición más alto fue sólo del 24,4% en terapias de sellado de 24 horas durante 7 días. En la **figura 16** se muestran todos los datos de los porcentajes de IR para todas las terapias estudiadas.

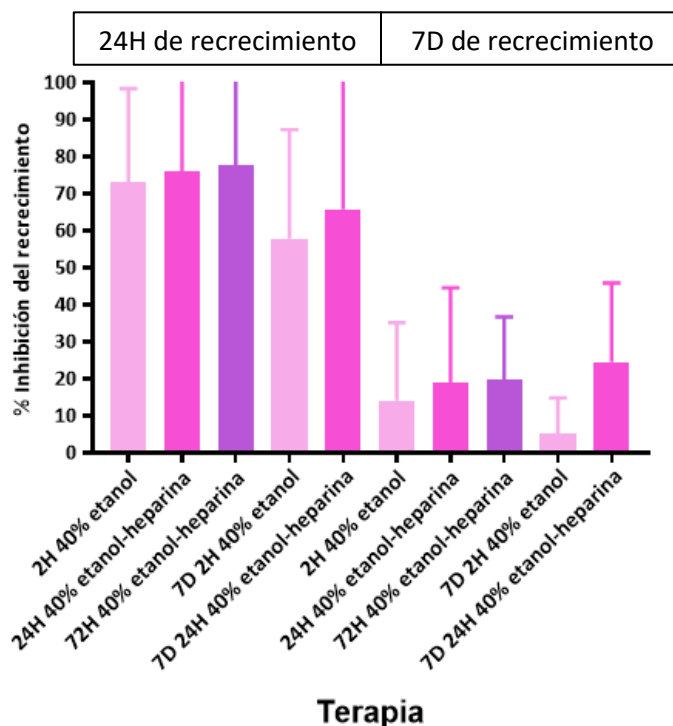


Figura 16. Porcentajes totales de inhibición del recrecimiento tras 24 horas y 7 días desde el fin de la terapia. Las terapias usadas fueron etanol al 40% durante 2 horas en dosis única y durante 7 días consecutivos, y combinado con heparina durante 24 horas (en dosis única y durante 7 días) y 72 horas. **7D**, 7 días; **2H**, 2 horas; **24H**, 24 horas; **72H**, 72 horas.

Dividiendo lo porcentajes por terciles donde $IR \leq 33,3\%$ son inhibiciones bajas, $33,4 < IR \leq 66,6\%$ inhibiciones moderadas, e $IR > 66,7\%$ inhibiciones altas, las terapias de 72 horas y recrecimientos de 24 horas mostraron inhibiciones altas para todas las especies llegando incluso al 100% en *C. albicans*. Sin embargo, con la misma terapia, pero un tiempo de recrecimiento de una semana este porcentaje disminuyó hasta ser de un 28,7%. Este fenómeno también se observó en el resto de las especies, donde la diferencia de las IR respecto a los tiempos de recrecimiento tras una terapia de 3 días con etanol combinado con heparina fue de más del 40% (**tabla 11**).

Tabla 11. Medias (DE) de los porcentajes de inhibición del recrecimiento tras 24 horas y 7 días de finalizar la terapia con etanol al 40% tanto solo como combinado con 60UI de heparina para *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* (aislado clínico), *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Candida albicans* ATCC14058, y *Escherichia coli* ATCC25922.

% DE INHIBICIÓN DEL RECRECIMIENTO TRAS 24 HORAS DE LA TERAPIA						
MO	TT	2H		24H		72H
		DU	7D	DU	7D	
<i>S. aureus</i>		65,3 (27)**	57,4 (25,6)**	91,0 (3,0)***	49,1 (27,1)**	94,6 (5,5)***
<i>S. epidermidis</i>		50,3 (19,8)**	75,6 (12,3)***	99,5 (0,9)***	75,8 (14,3)***	70,4 (18,5)***
<i>E. faecalis</i>		72,9 (18,9)***	73,2 (23,1)***	69,2 (14,8)***	92,4 (2,8)***	72,6 (14,6)***
<i>C. albicans</i>		94,9 (7,1)***	51,6 (23,6)**	100,0 (0,0)***	96,9 (1,4)***	99,5 (1,1)***
<i>E. coli</i>		82,0 (24,3)***	31,1 (31,9)*	19,5 (10,1)*	14,7 (21,2)*	67,0 (23,7)***
Global		73,1 (31,4)***	57,8 (29,4)**	75,8 (31,4)***	65,7 (34,8)**	77,5 (25,6)***

% DE INHIBICIÓN DEL RECERCIMIENTO TRAS 7 DÍAS DE LA TERAPIA						
MO	TT	2H		24H		72H
		DU	7D	DU	7D	
<i>S. aureus</i>		7,8 (10,6)*	8,3 (10,8)*	20,0 (23,0)*	18,7 (19,2)*	12,9 (8,2)*
<i>S. epidermidis</i>		36,1 (32,3)**	5,1 (14,5)*	32,8 (34,9)*	23,1 (21,5)*	30,1 (21,2)*
<i>E. faecalis</i>		14,2 (16,5)*	2,8 (7,9)*	22,8 (25,5)*	44,1 (25,2)**	21,2 (21,3)*
<i>C. albicans</i>		4,5 (4,7)*	3,1 (3,8)*	7,5 (11,9)*	17,9 (8,1)*	28,7 (5,4)*
<i>E. coli</i>		8,0 (19,9)*	6,8 (7,2)*	10,9 (19,4)*	16,4 (14,8)*	5,1 (6,6)*
Global		14,1 (21,0)*	5,2 (9,4)*	18,8 (25,7)*	24,4 (21,4)*	19,6 (17,1)*

DE, desviación estándar; MO, microorganismo; TT, tiempo de terapia; DU, dosis única; 7D, 7 días; 2H, 2 horas; 24H, 24 horas; 72H, 72 horas.

*Baja inhibición de recrecimiento ($\leq 33.3\%$)

**Moderada inhibición de recrecimiento ($33.4\% \leq X \leq 66.6\%$)

***Alta inhibición de recrecimiento ($\geq 66.7\%$)

1.3. Actividad de la heparina combinada con diferentes concentraciones de etanol.

Para evaluar la actividad de la heparina una vez combinada con etanol en las 3 concentraciones estudiadas (25%, 40%, y 70%), y en tiempos de terapia de 2 horas, 24 horas y 72 horas, se usó el ensayo automatizado para calcular la capacidad antitrombótica de la heparina mediante el factor anti-Xa.

La **figura 17** muestra los valores de UI/ml de heparina libre para todas las soluciones combinadas con etanol, así como para un control, el cual solo se compuso de agua y 60 UI de heparina. Todas las muestras fueron testadas sobre un pool de plasma de pacientes con valores de coagulación normal.

En este ensayo no se observaron diferencias significativas entre las soluciones de etanol al 25% y 40% respecto al control. Sin embargo, cuando el etanol tenía una concentración del 70%, se pudo observar una reducción de la heparina en 2UI/ml en todos los tiempos de incubación. Dicho fenómeno hace descartar el etanol al 70% combinado con heparina como posible solución de sellado para terapias mayores a 2 horas.

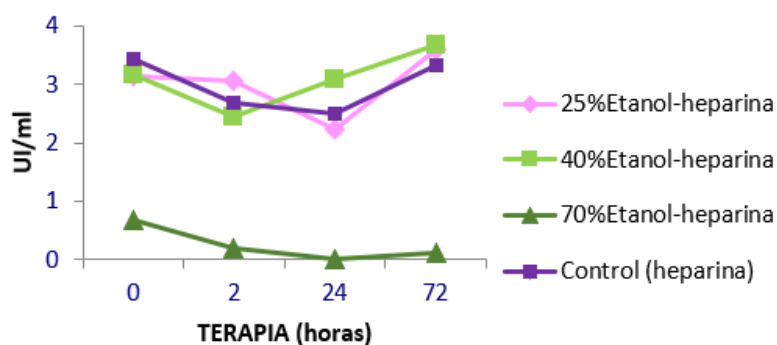


Figura 17. Unidades internacionales/ml de heparina libre tras combinarse con etanol al 25% (rosa), 40% (verde), y 70% (naranja) durante 2 horas, 24 horas, y 72 horas. En morado se muestra el control (heparina con agua).

1.4. Optimización de la concentración y del tiempo de tratamiento del etanol y la enoxaparina en cepas ATCC.

Una vez se observó que etanol al 40% combinado con heparina era la concentración idónea para eliminar el BF, se evaluó la capacidad del etanol en concentraciones aún más bajas (30% y 35%) comparándolas con las de etanol al 40%, tanto solas como combinadas con otro anticoagulante de la familia de las heparinas de bajo peso molecular, la enoxaparina.

Las medias globales de la reducción metabólica para las diferentes soluciones de sellado en los tiempos de tratamiento (2 horas y 24 horas) se muestran en la **figura 18**.

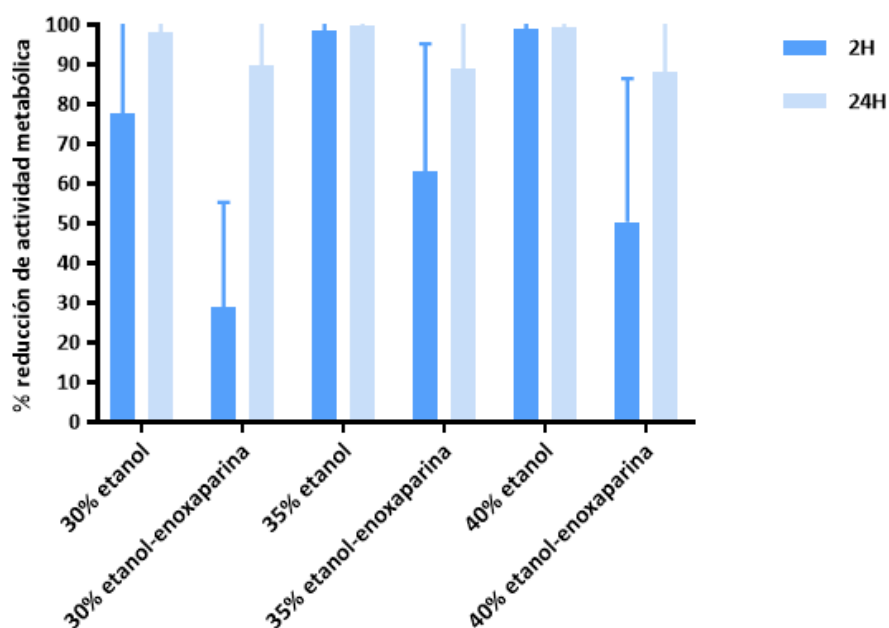


Figura 18. Medias globales de reducción de la actividad metabólica de los biofilms preformados de *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* (aislado clínico), *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Candida albicans* ATCC14058, y *Escherichia coli* ATCC25922, tras la terapia que etanol y enoxaparina durante 2 horas y 24 horas.

Las mejores terapias fueron aquellas compuestas de etanol en concentraciones de 35% y 40% durante 2 horas de exposición, o las tres concentraciones estudiadas para 24 horas de tratamiento, alcanzando una reducción > 90% en todos los casos ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando el etanol fue combinado con enoxaparina, los porcentajes de reducción fueron mucho más bajos, sin llegar en ningún caso a alcanzar el 90% de reducción. En terapias de 2 horas, el etanol al 35% combinado con enoxaparina redujo el 63,2% de la actividad metabólica de todos los biofilms estudiados. Aumentando el tiempo de exposición a 24 horas, la concentración más eficaz de etanol con enoxaparina fue al 30% (89,9% de reducción de actividad metabólica).

Atendiendo a la eficacia de estas soluciones a nivel de especie (**figura 19**), en las terapias de 2 horas, las soluciones de etanol al 35% y 40% consiguieron reducir $\geq 90\%$ de la actividad metabólica del biofilm de todas las especies y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p > 0,05$). En el caso del etanol al 30%, esta eficacia se observó en *S. epidermidis* (93,1%) y *E. coli* (98,9%) (**figura 19B y D**). Combinado con enoxaparina, el etanol al 30% presentó reducciones muy variadas desde 12,5% en *S. aureus*, hasta 57,0% en *E. faecalis* (**figura 19A y C**). Con concentraciones de 35% y 40% de etanol, las soluciones con anticoagulante aumentaron su actividad anti-biofilm alcanzando hasta un 90,0% y 87,6% de reducción en *S. aureus* y 88,2% y 78,2% en *E. coli*, respectivamente (**figura 19A y D**). *C. albicans* mostró porcentajes de reducción muy bajos cuando el etanol se combinó con la enoxaparina, llegando a ser incluso 0,0% para la solución de etanol al 40% (**figura 19E**). Para tiempos de exposición de 24 horas, la reducción en la actividad metabólica fue estadísticamente significativa en todas las especies para todas las soluciones de etanol sin anticoagulante (**figura 19**). Sin embargo, en combinación con la enoxaparina, esta reducción solo fue significativa para *S.*

epidermidis, *E. coli*, y *C. albicans* con todas las concentraciones de etanol ($p < 0,001$). En *S. aureus* se observó una reducción del 99,2% con la solución de etanol al 30% combinado con enoxaparina, pero este porcentaje disminuyó a medida que la concentración de etanol aumentaba, hasta alcanzar un 83,7% con la concentración del 40% (figura 19A). En *E. faecalis* no se alcanzó el 90% de reducción con ninguna de las concentraciones combinadas con el anticoagulante.

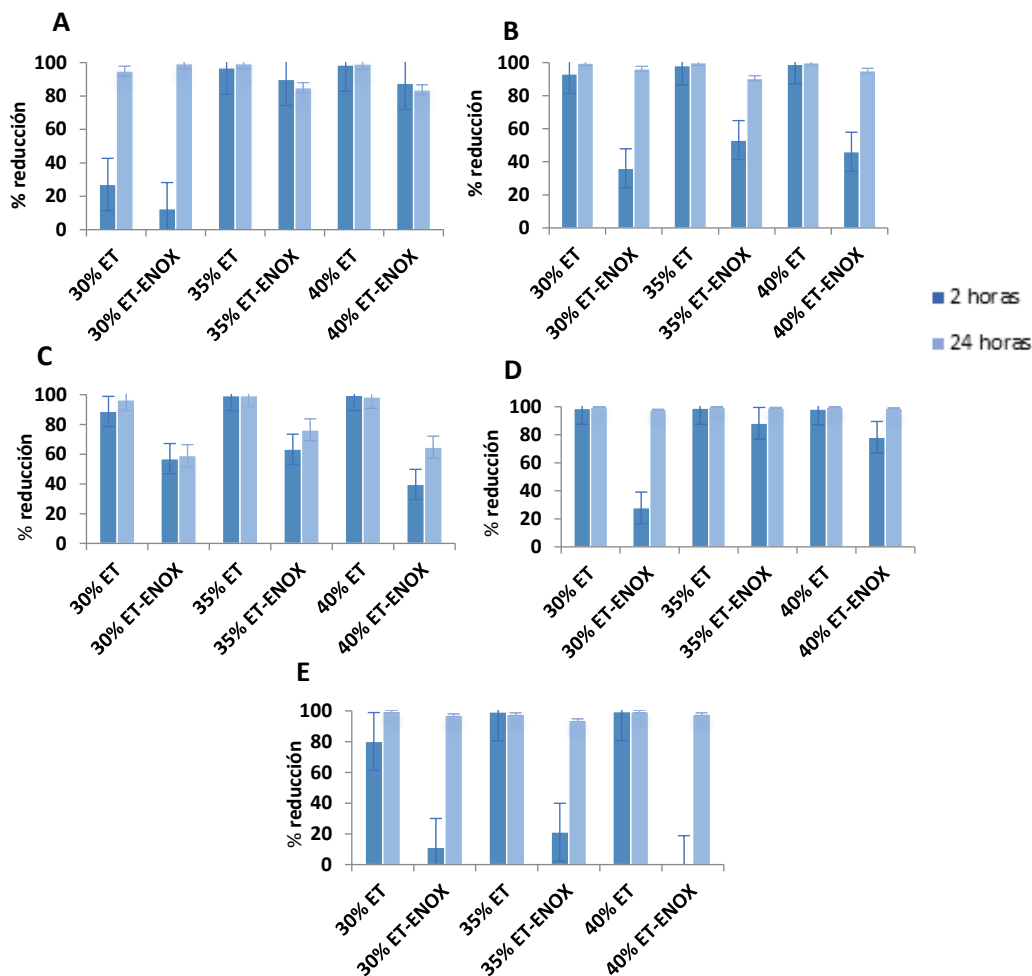


Figura 19. Reducción de la actividad metabólica tras las terapias de 2 y 24 horas con las soluciones de sellado con etanol y enoxaparina para **A** *Staphylococcus aureus* ATCC29213, **B** *Staphylococcus epidermidis* (aislado clínico), **C** *Enterococcus faecalis* ATCC33186, **D** *Escherichia coli* ATCC25922, **E** *Candida albicans* ATCC14058. ET, etanol; ENOX, enoxaparina.

De esta forma, las soluciones más eficaces fueron aquellas compuestas solo de etanol al 35% y 40% en terapias de 2 y 24 horas sin anticoagulante.

1.5. Capacidad del etanol combinado con heparina para erradicar el biofilm de cepas clínicas causantes de BRC en un modelo *in vitro*.

Una vez descartada la enoxaparina como posible anticoagulante combinada con etanol por afectarle negativamente a éste su capacidad anti-biofilm, se evaluó la capacidad de una solución de etanol al 40% (por mostrar los mejores porcentajes generales de reducción de actividad metabólica), en combinación con 60 UI de heparina, para erradicar el biofilm de cepas clínicas causantes de BRC.

Se analizaron 100 cepas clínicas de hemocultivos positivos con BRC confirmada de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococci sp.*, *E. coli*, y *C. albicans* (20 cepas de cada especie).

De manera global sobre el total de las cepas estudiadas, la solución de sellado de etanol con heparina aplicada durante 72 horas consiguió reducir la biomasa y la actividad metabólica del biofilm en un 50% y 83%, respectivamente, de todas las cepas. La **tabla 12** describe la distribución de las especies en las cuales el tratamiento fue eficaz (reducciones $\geq 85\%$).

De forma general, los porcentajes de reducción de la actividad metabólica fueron mejores que los de reducción de la biomasa (94,4% vs. 77,4%, respectivamente). En este último caso, el éxito máximo de la terapia se consiguió en *Enterococci sp.*, y *E. coli*, donde el tratamiento fue exitoso en un 95% de las cepas. Sin embargo, la solución de sellado no fue capaz de reducir en $>85\%$ la biomasa del biofilm de ninguna cepa de *C. albicans*. En cuanto a la reducción de la actividad metabólica, la solución de sellado fue eficaz en

todas las cepas de *E. coli* y *C. albicans*. Sin embargo, en las cepas de *S. aureus* la terapia de sellado solo fue eficaz en el 40% de los casos.

Tabla 12. Distribución de cepas en las que la solución de sellado de etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina durante 72 horas redujo el biofilm en >85% (éxito).

MO	Porcentaje de éxito*, N (%)	
	CV	XTT
<i>S. aureus</i> (N=20)	7 (35)	8 (40)
ECN (N=20)	5 (25)	16 (80)
<i>Enterococci sp.</i> (N=20)	19 (95)	19 (95)
<i>E. coli</i> (N=20)	19 (95)	20 (100)
<i>C. albicans</i> (N=20)	0 (0)	20 (100)
Total (N=100)	50 (50)	83 (83)

MO, microorganismos; CV, cristal violeta; ECN, estafilococo coagulasa negativo.

*El éxito de la terapia se definió como reducciones $\geq 85\%$.

Los porcentajes globales de reducción tanto de biomasa como de actividad metabólica para cada especie se muestran en la **figura 20**. Estos porcentajes fluctuaron desde un 47,5% en *C. albicans* hasta un 95,2% en *Enterococci sp.*, ($p < 0,001$) en los ensayos de CV, y desde un 84,8% en *S. aureus* hasta un 100% en *E. coli* ($p < 0,001$) en los ensayos de XTT.

A pesar de que la solución de sellado de etanol mostró mayor actividad anti-biofilm en determinadas especies, estas diferencias no se encontraron intra-especie ($p > 0,05$) (**figura 21**). Por tanto, la terapia fue igual de eficaz en SARM y SASM, en *E. faecalis* y *E. faecium*, y en *S. epidermidis* y ECN.

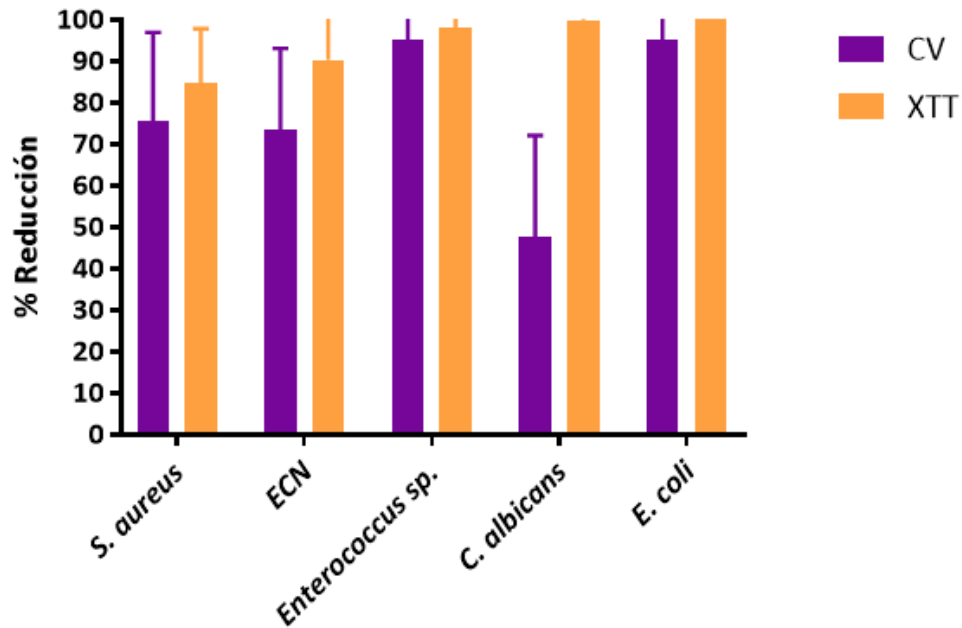


Figura 20. Porcentajes generales de reducción de la biomasa y de la actividad metabólica para especies causantes de BRC tras tratarse durante 72 horas con una solución de sellado de etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina. **ECN**, estafilococo coagulasa negativo.

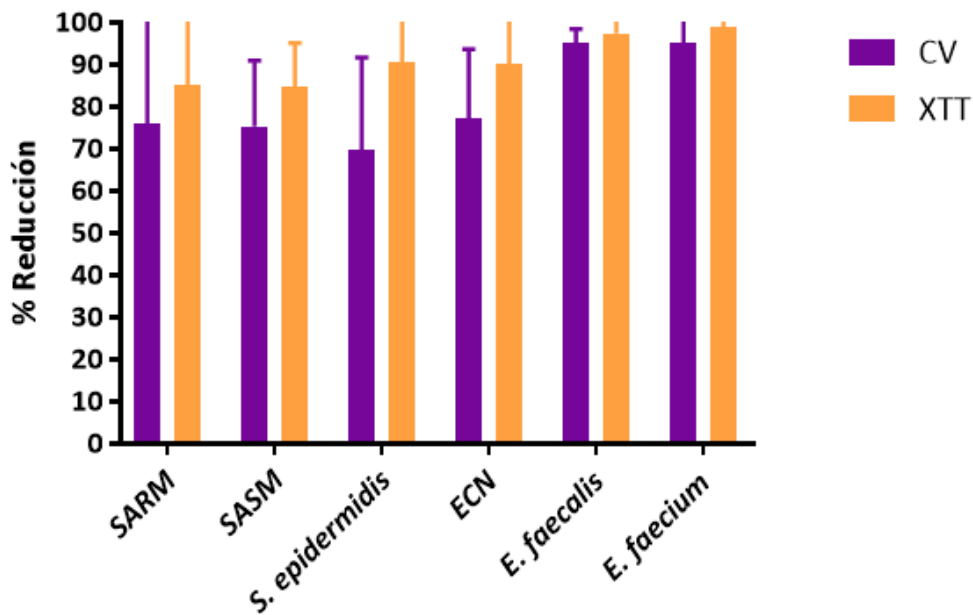


Figura 21. Porcentajes de reducción de biomasa y actividad metabólica intra-especies tras el tratamiento de 72 horas con una solución de sellado de etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina. **SARM**, *S. aureus* resistente a meticilina; **SASM**, *S. aureus* sensible a meticilina; **ECN**, estafilococo coagulasa negativo.

Una vez se finalizó la terapia de 72 horas, se evaluó la capacidad de inhibición del recrecimiento (IR) de los biofilms a las 24 horas y a los 3 días. En la **tabla 13** se muestra la distribución del número de cepas en las que la terapia fue eficaz (IR \geq 85%. Únicamente la IR fue $>85\%$ en todas las cepas de *C. albicans* sólo para tiempos de recrecimiento de 24 horas. Sin embargo, en los recrecimientos evaluados a los 3 días, la IR solo fue de $\geq 85\%$ en 2 de las cepas de esta especie.

Los porcentajes de IR globales fueron del 76.5% y del 46.8% tras las 24 horas y los 3 días, respectivamente. La **figura 22** muestra los porcentajes globales de IR para cada especie. En los recrecimientos tras 24 horas, los mejores porcentajes de IR se consiguieron en *C. albicans* (98,5%), mientras que, los más bajos se observaron en *Enterococci* sp., (36,8%), ($p < 0,001$).

Por otro lado, en recrecimientos tras 3 días, los porcentajes de IR disminuyeron significativamente en todas las especies excepto en *S. aureus*, especie en la que se obtuvo el mayor porcentaje de IR (81,2%) en ambos tiempos de recrecimiento estudiados.

Por tanto, la terapia de sellado basada en etanol durante 72 horas previene significativamente el recrecimiento del biofilm de ciertas especies, sobre todo fúngicas, mientras que en otras no es capaz de impedir que vuelvan a crecer.

Tabla 13. Distribución global de cepas en las que la solución de sellado de etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina durante 72 horas inhibió en >85% el crecimiento del biofilm tras 24 horas y 3 días.

MO	Porcentaje de éxitos* de IR, N (%)	
	24 horas	3 días
<i>S. aureus</i> (N=20)	13 (65)	10 (50)
ECN (N=20)	12 (60)	1 (5)
<i>Enterococci sp.</i> (N=20)	1 (5)	0 (0)
<i>E. coli</i> (N=20)	11 (55)	4 (20)
<i>C. albicans</i> (N=20)	20 (100)	2 (10)
Total (N=100)	57 (57)	17 (17)

MO, microorganismo; IR, inhibición del crecimiento; ECN, estafilococo coagulasa negativo.

*Los éxitos se definieron como IR \geq 85%.

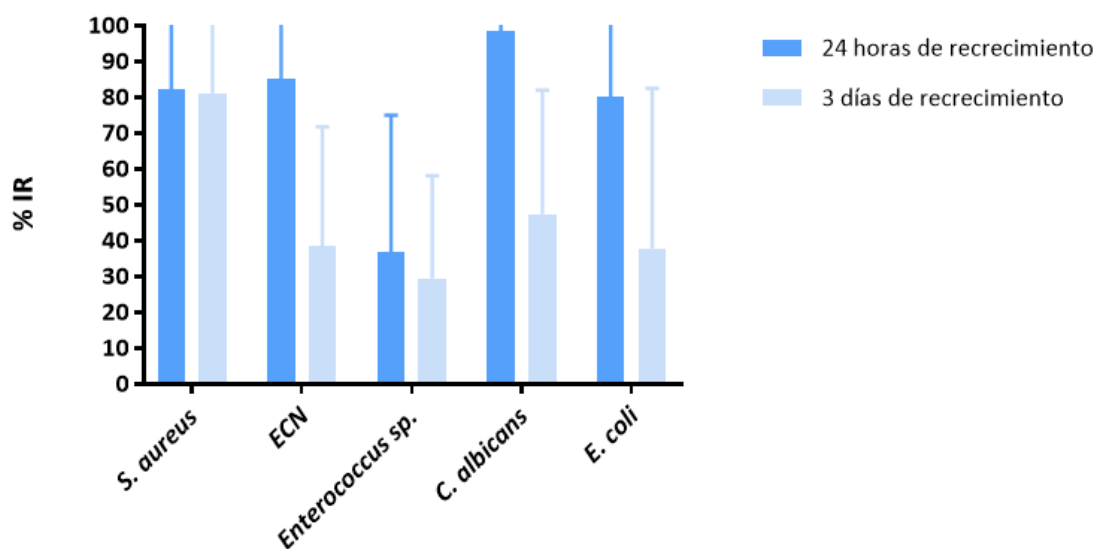


Figura 22. Porcentajes de inhibición del crecimiento para cada especie tras 24 horas y 3 días de la finalización de la terapia de sellado con etanol al 40% con 60 UI de heparina durante 72 horas. IR, inhibición del crecimiento; ECN, estafilococo coagulasa negativo.

Al igual que con los porcentajes de reducción de CV y XTT, en el porcentaje de IR tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas intra-especie ($p>0,05$) (figura 23). Sin embargo, sí se observaron porcentajes de IR más bajos en SASM, ECN y *E. faecium* con respecto a sus homólogos.

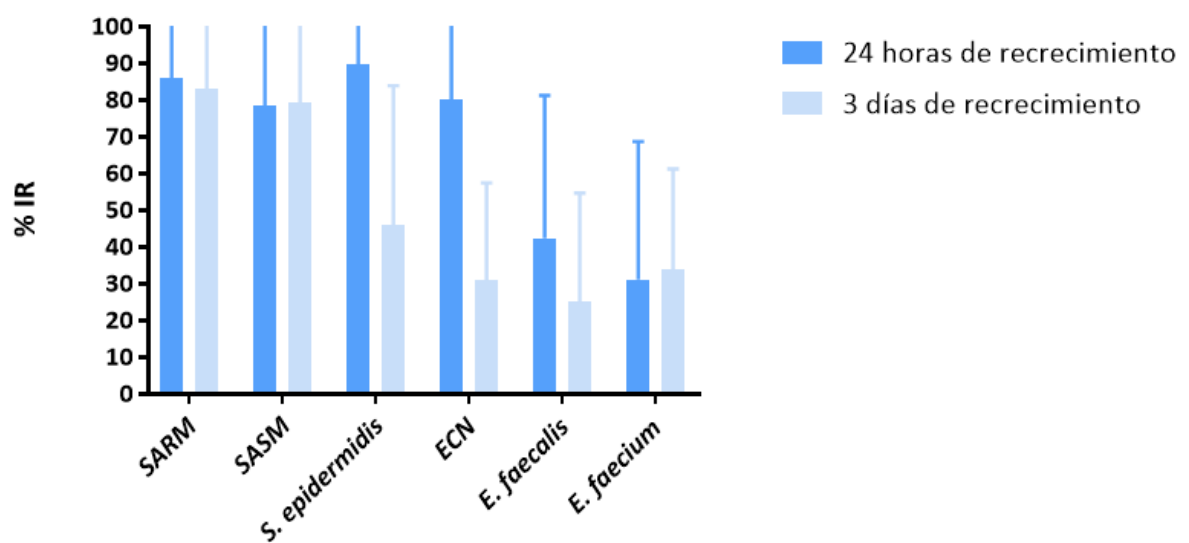


Figura 23. Porcentajes de inhibición del recrecimiento intra-especie tras 24 horas y 3 días de haber finalizado la terapia de sellado con etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina durante 72 horas. **IR**, inhibición del recrecimiento; **SARM**, *S. aureus* resistente a metilina; **SASM**, *S. aureus* sensible a metilina; **ECN**, estafilococo coagulasa negativo.

2. La SDD usada como terapia de cierre en el TET previene y erradica el biofilm en un modelo *in vitro* de NAVM.

Una vez los tubos se procesaron, se obtuvieron 4 tipos de resultados para cada terapia: presencia de células vivas detectadas mediante microscopía confocal, recuento de ufc/ml mediante cultivo convencional, tamaño y estructura del biofilm sobre el TET observada mediante microscopía electrónica de barrido.

Todos los resultados cuantificables se muestran en la **tabla 14**.

2.1. Terapia de profilaxis.

Para la terapia de profilaxis durante 5 días se observó una ausencia total de células vivas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus*, $p < 0,001$, $p < 0,001$, y $p = 0,008$, respectivamente (**figura 24**). Asimismo, aunque el límite de detección para el recuento de ufc/ml es de < 10 ufc/ml, no se obtuvo crecimiento para ninguno de los 3 microorganismos ($p = 0,004$ para *P. aeruginosa*, y $p = 0,002$ para *E. coli* y *S. aureus*). La **figura 25** muestra los cambios en el grosor del biofilm tras la terapia de profilaxis comparada con los controles positivos. Ninguno de los microorganismos fue capaz de adherirse a la superficie del TET tras la terapia de profilaxis con SDD.

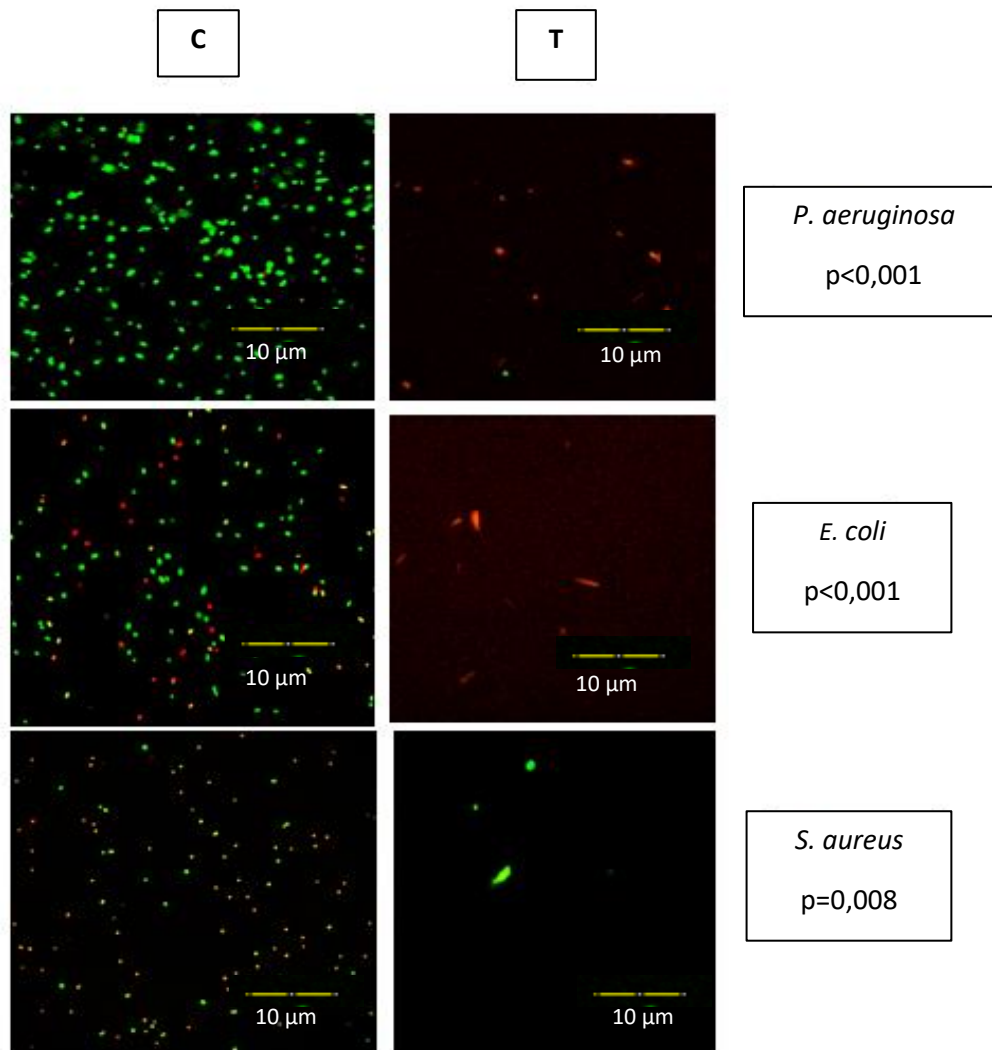


Figura 24. Células vivas (verdes) y muertas (rojas) de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus*, tras la terapia de profilaxis con SDD de 2 horas/día durante 5 días. Se encontraron diferencias estadísticas en todos los casos usando el test de Mann-Whitney ($p<0,05$). C, control positivo; T, muestras tratadas.

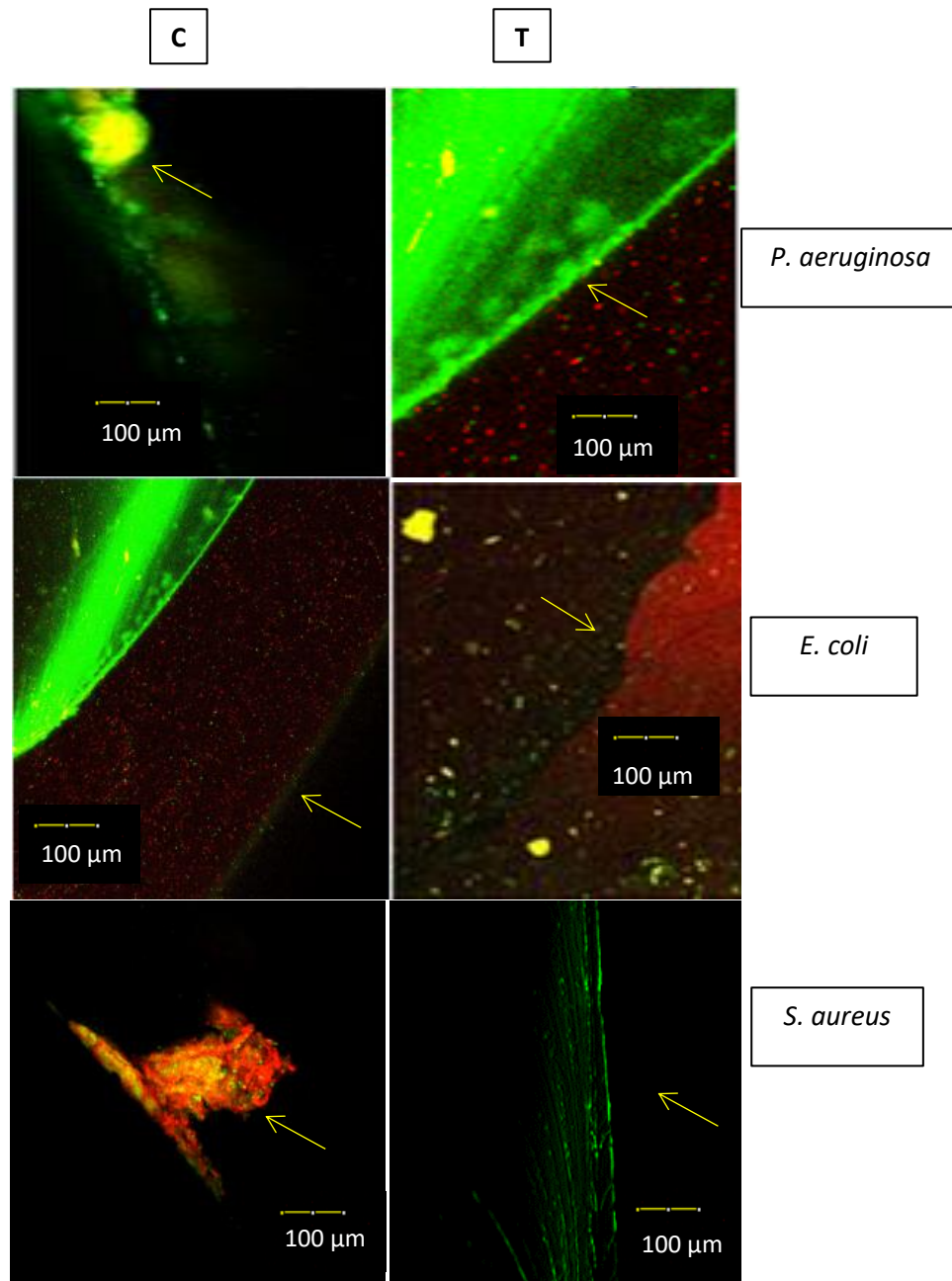


Figura 25. Grosor del biofilm de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* antes y después de la terapia de 2 horas/día de profilaxis con SDD durante 5 días. Las flechas indican el biofilm formado en los controles positivos y la superficie de los tubos en las muestras tratadas. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal. C, control positivo; T, muestras tratadas.

Asimismo, mediante microscopía confocal de barrido se observó la gran diferencia en la estructura del biofilm entre los controles positivos y las muestras tratadas. En estas últimas sólo se observaron restos de antibiótico y células muertas, mientras que, en los controles positivos, los biofilms estaban bien definidos con la presencia de cocos o bacilos rodeados de una ME (figura 26).

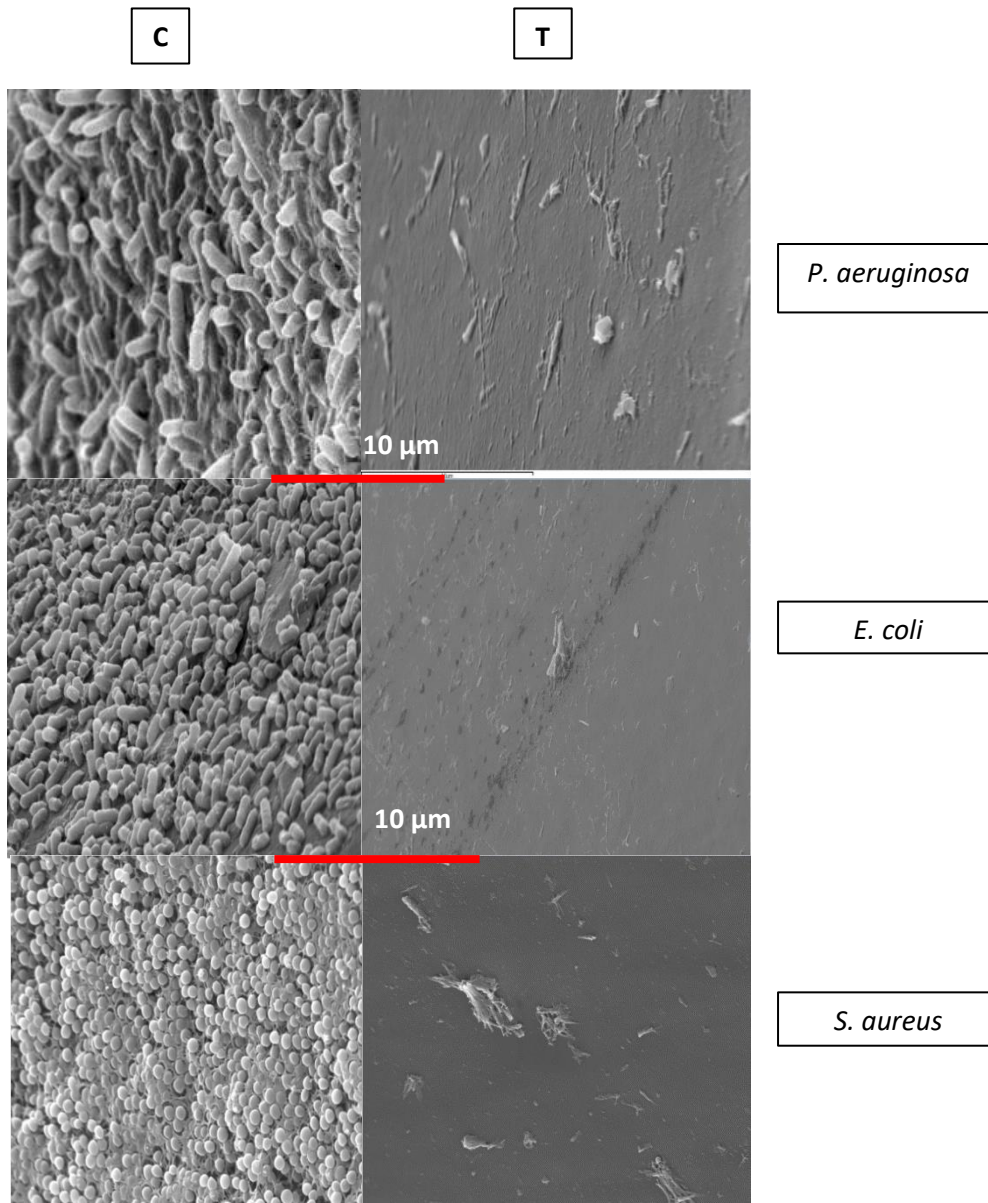


Figura 26. Estructura del biofilm observada mediante microscopía electrónica de barrido para los controles positivos (C) y las muestras tratadas (T) con terapia de profilaxis con SDD de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* con un aumento de 500X.

2.2. Terapia de tratamiento.

Tras haber formado un biofilm maduro de 72 horas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* sobre el TET, se trataron durante 2 horas/día 5 días seguidos. Así, los porcentajes de reducción de células vivas, expresados como la mediana (RIQ), fueron respectivamente: 53,2% (39,4%-64,1%), 67,9% (46,7%-78,7%), y 100,0% (100,0%-100,0%), lo que correspondió a una significación estadística entre las muestras tratadas y los controles positivos de $p < 0,001$, $p = 0,002$, y $p = 0,007$, respectivamente (**tabla 14**) (**figura 27**).

En el caso del recuento de ufc en placa, todas las reducciones resultaron ser del 100% ($p = 0,002$), lo que indicó que no se pudieron recuperar células cultivables de los biofilms de *P. aeruginosa*, *E. coli*, o *S. aureus* tras la terapia de tratamiento con SDD (**tabla 14**).

El grosor y la estructura del biofilm, tanto de los controles positivos como de las muestras tratadas, de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* tras la terapia de sellado se muestra en las **figuras 28 y 29**, respectivamente.

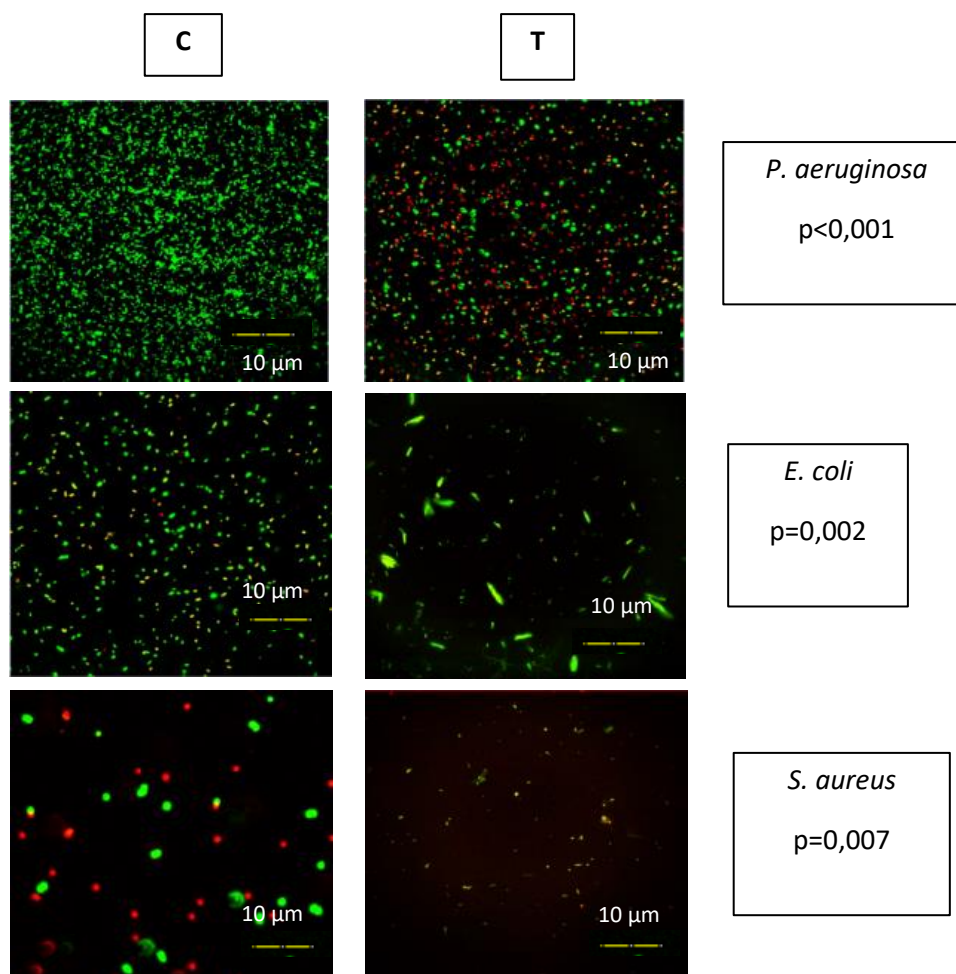


Figura 27. Células vivas (verdes) y muertas (rojas) de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S aureus*, tras la terapia de tratamiento con SDD de 2 horas/día durante 5 días. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos usando el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). C, control positivo; T, muestras tratadas.

Mediante microscopía confocal, en los controles positivos se observó un biofilm delgado. Asimismo, atendiendo a su estructura, los controles positivos presentaron una multicapa de células rodeadas por una ME. Sin embargo, en las muestras tratadas, el biofilm desapareció o disminuyó significativamente, la ME se observó completamente

disgregada, y las células presentaron anomalías tanto en el tamaño como en la forma.

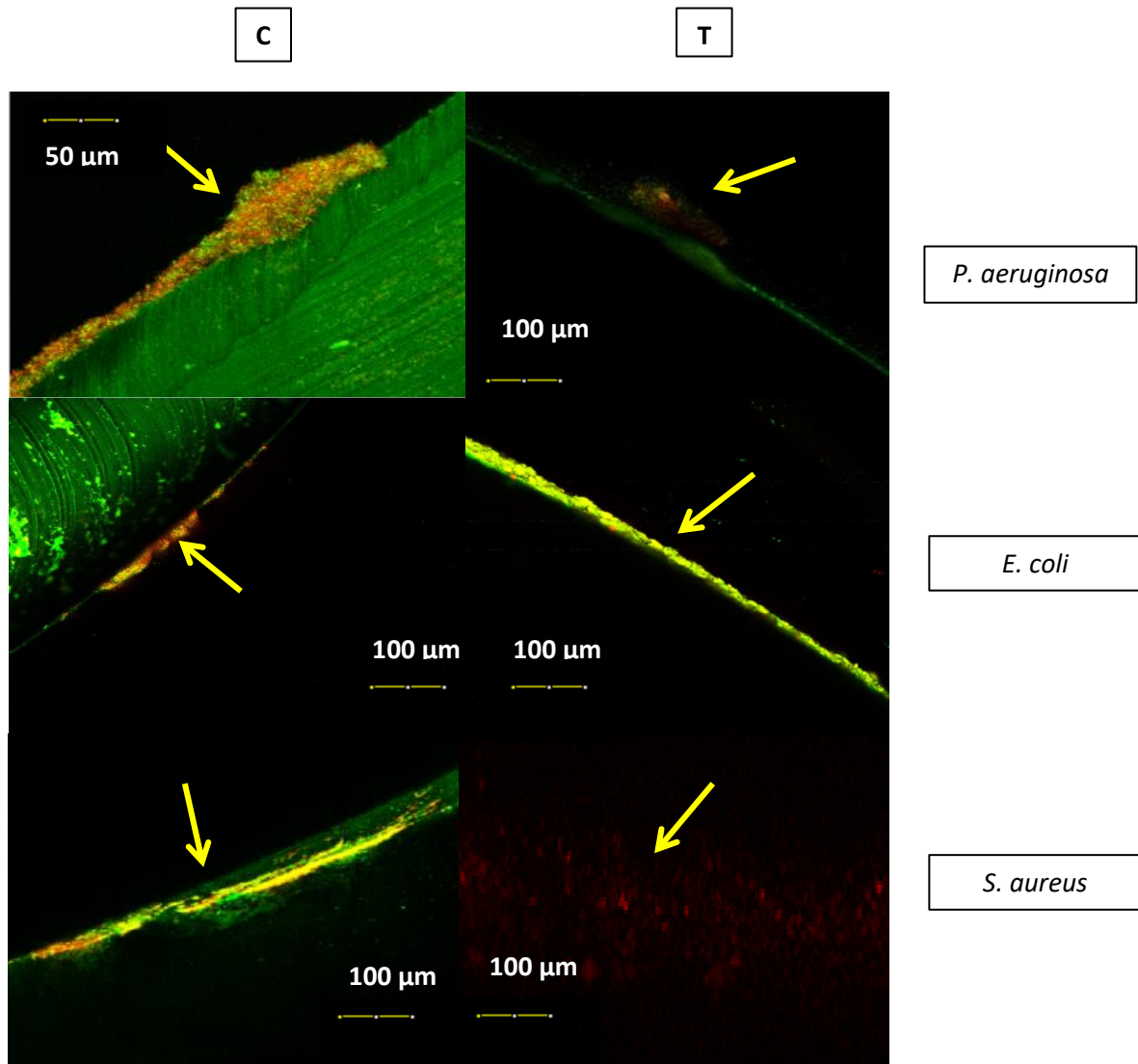


Figura 28. Grosor del biofilm de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* antes y después de la terapia de 2 horas/día de tratamiento con SDD durante 5 días. Las flechas indican el biofilm formado en los controles positivos y la superficie de los tubos en las muestras tratadas. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal. C, control positivo; T, muestras tratadas.

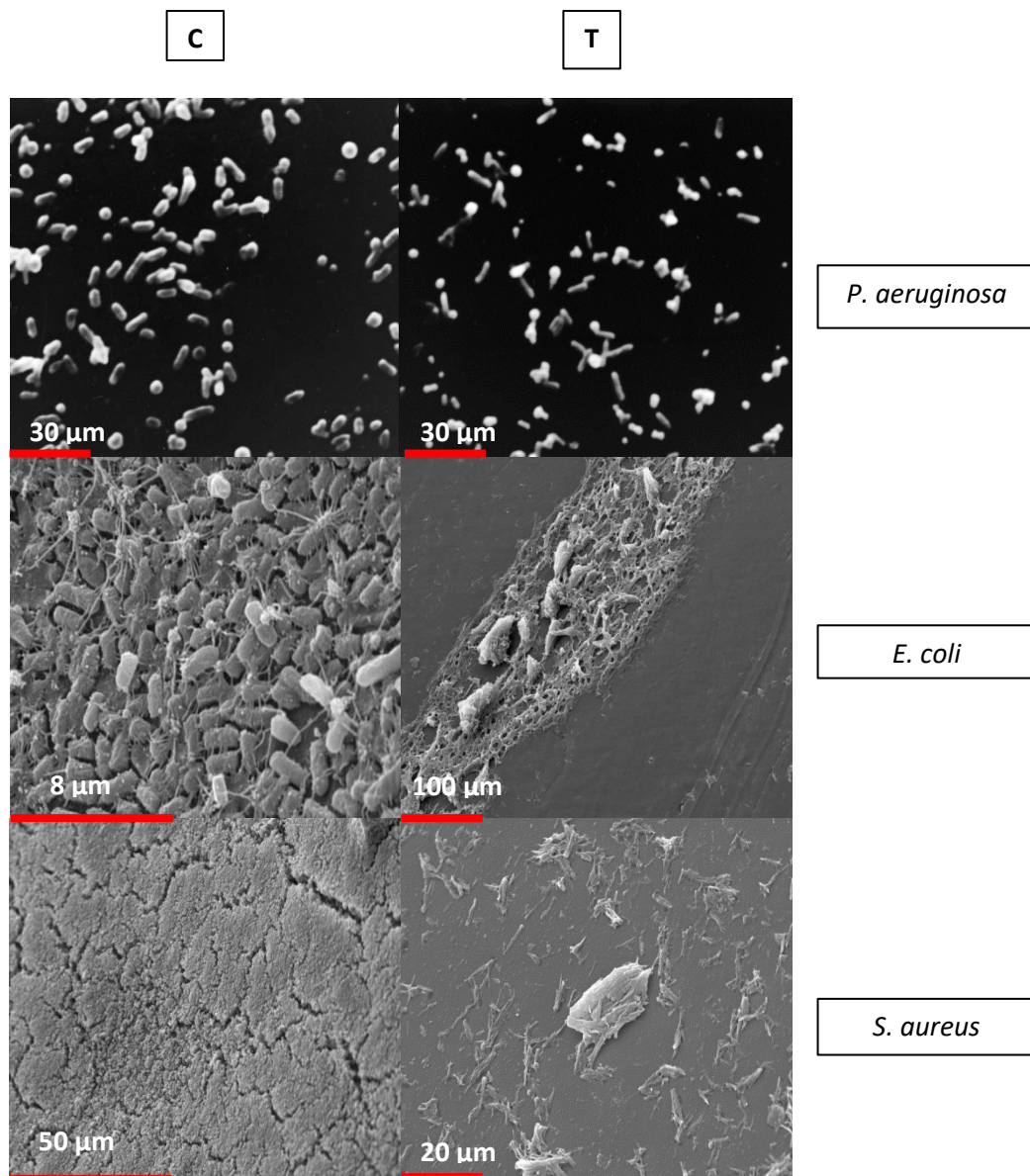


Figura 29. Estructura del biofilm observada mediante microscopía electrónica de barrido para los controles positivos (C) y las muestras tratadas (T) con terapia de tratamiento con SDD de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus*.

2.3. Test de filtración.

No se recuperó resto alguno de SDD ni de suero salino tras finalizar las terapias de profilaxis y tratamiento. Las soluciones en contacto con el espacio subglótico no traspasaron el neumo-taponamiento.

Tabla 14. Mediana (RIQ) del porcentaje de células vivas, recuento de ufc/ml (en log₁₀) y de sus porcentajes de reducción para las bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* tras las terapias de 2 horas de profilaxis y tratamiento con SDD durante 5 días en un modelo *in vitro* de NAVM.

Terapia	MO	Mediana (RIQ) % células vivas		Mediana (RIQ) % reducción de células vivas	P valor	Mediana (RIQ) log ₁₀ ufc/ml*		Mediana (RIQ) % reducción** de ufc/ml*	P valor
		C+	TAS			C+	TAS		
Tratamiento	<i>P. aeruginosa</i>	88,9 (84,4-93,4)	39,3 (30,1-50,9)	53,2 (39,4-64,1)	<0,001	7,5 (7,4- ^b)	- ^a	100,0 (100,0-100,0)	0,002
	<i>E. coli</i>	55,9 (49,6-67,3)	18,8 (12,5-31,2)	67,9 (46,7-78,7)	0,002	7,0 (6,7-7,4)	- ^a	100,0 (100,0-100,0)	0,002
	<i>S. aureus</i>	42,9 (28,7-57,5)	0,0 (0,0-0,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,007	7,7 (7,5-7,9)	- ^a	100,0 (100,0-100,0)	0,002
Profilaxis	<i>P. aeruginosa</i>	83,1 (77,0-88,4)	0,0 (0,0-0,0)	100,0 (100,0-100,0)	<0,001	7,4 (6,9-8,4)	- ^a	**ausencia	0,004
	<i>E. coli</i>	43,9 (34,1-46,1)	0,0 (0,0-0,0)	100,0 (100,0-100,0)	<0,001	7,2 (6,9-7,34)	- ^a	** ausencia	0,002
	<i>S. aureus</i>	32,7 (23,7-49,7)	0,0 (0,0-0,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,008	7,6 (7,4-7,8)	- ^a	** ausencia	0,002

Los **p valor** se obtuvieron usando el test de Mann-Whitney y se consideró estadísticamente significativo p<0,05. ^a No se recuperaron células después de la terapia. El recuento de ufc/ml fue de 0,0 (0,0-0,0) para todos los microorganismos tras la terapia siendo log₁₀ 0 incalculable. ^b No se obtuvo un p75 valor. *El límite de detección usando cultivo convencional para el recuento de ufc/ml fue de 10 ufc/ml. ** En las terapias de profilaxis, no se pudo medir un porcentaje de reducción ya que no existía un biofilm preformado con el que comparar. Los resultados se expresan como ausencia de células.

MO, microorganismo; **RIQ**, rango intercuartílico; **ufc**, unidades formadoras de colonia; **C+**, control positivo; **TAS**, terapia antibiótica de sellado.

3. Las cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con NAVM presentan diferencias en su virulencia *in vivo* pero no fenotípicamente respecto a cepas provenientes de otros lugares de infección.

En total se analizaron 40 cepas de casos y 50 cepas de controles y se compararon en términos de formación de biofilm, producción de pigmentos, y presencia de genes de virulencia. Para los estudios de virulencia *in vivo* en modelo de *G. mellonella* sólo se pudieron comparar 8 cepas de casos y 8 cepas de controles, arbitrariamente elegidas.

3.1. Formación de biofilm.

Al analizar la capacidad de las 90 cepas para producir biofilm en términos de biomasa, se observó que 76 (84,4%) fueron altamente productoras, 13 (14,5%) fueron moderadamente productoras, y 1 (1,1%) fue bajamente productora. En relación con la actividad metabólica de los biofilms, 17 (18,9%) tuvieron una actividad metabólica alta, 34 (37,8%) tuvieron una actividad metabólica moderada, y 39 (43,3%) tuvieron una actividad metabólica baja. La distribución de las cepas productoras de biofilm clasificadas como casos o controles se recoge en la **tabla 15**. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grado de producción de biofilm entre los casos y los controles ($p > 0,05$). En la **figura 30** se muestra un ejemplo de formación de biofilm revelado mediante CV y XTT.

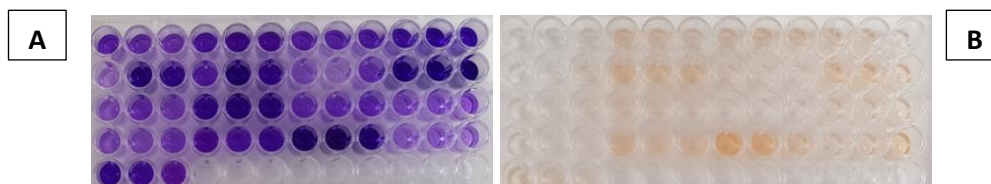


Figura 30. Formación de biofilm de *P. aeruginosa* revelado mediante CV (A) y XTT (B).

Tabla 15. Distribución de las cepas casos y controles según la capacidad de producir biofilm evaluada mediante cristal violeta (biomasa) y XTT (actividad metabólica).

	CV			XTT		
	Bajas, N (%)	Moderadas, N (%)	Altas, N (%)	Bajas, N (%)	Moderadas, N (%)	Altas, N (%)
Controles	0 (0,0)	8 (8,9)	42 (46,7)	18 (20,0)	20 (22,2)	12 (13,3)
Casos	1 (1,1)	5 (5,6)	34 (37,7)	21 (23,0)	14 (15,6)	5 (5,6)
Total	1 (1,1)	13 (14,5)	76 (84,4)	39 (43,3)	34 (37,8)	17 (18,9)

CV, cristal violeta; XTT, 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida.

3.2. Aspecto mucoso de las colonias y producción de pigmentos.

Otros de los factores de virulencia fenotípicos de *P. aeruginosa* son la mucosidad de sus colonias y la producción de pigmentos como pioverdina y piocianina. Todas las cepas resultaron ser no mucosas tras un cultivo de 24 horas a 37°C. En toda la colección de cepas se observó que el 74,4% de las cepas secretaban pioverdina, el 7,8% secretaba piocianina, el 10% secretaban ambos pigmentos, y el 7,8% ninguno de ellos. La producción de pioverdina fue más frecuente que la de piocianina en las cepas causantes de NAVM (92,5% vs. 7,5%, respectivamente) ($p < 0,001$). Asimismo, se observó una mayor producción de piocianina en los controles (26%) que en los casos ($p = 0,023$). Las cepas que no produjeron ningún tipo de pigmento pertenecieron al grupo de los controles.

3.3. Presencia de genes de virulencia.

Todas las cepas presentaron, al menos, 10 de los 14 genes de virulencia estudiados. Los genes *AlgD*, *LasB*, *plcN*, *plcH* y *ExoT* se encontraron en todas las cepas. Los genes *Apr*, *LasI*, *LasR* y *ExoY* se encontraron en el 99%, 98%, 97%, y 93% de las cepas, respectivamente. Por otra parte, la incidencia del resto de genes fue menor: *rhII* (82%), *rhIR* (81%), *AlgU* (82%) y *ExoS* (76%). El gen *ExoU* solamente se encontró en el 31,1% de los aislados.

En dos de las cepas se observó la presencia de uno de los genes que codifican los inductores del quorum-sensing (*LasI* y *rhII*) pero ausencia del gen que codifica su receptor (*LasR* y *rhIR*, respectivamente). La distribución de los genes de virulencia entre casos y controles no fue estadísticamente significativa para ninguno de los genes ($p > 0,05$) (**tabla 16**). Sin embargo, en las cepas control se observó una tendencia a la ausencia de los genes del quorum-sensing *rhII* y *rhIR* en comparación con las cepas controles ($p = 0,084$ y $p = 0,054$, respectivamente).

Tabla 16. Distribución de los genes de virulencia *AlgD*, *AlgU*, *plcH*, *plcN*, *ExoS*, *ExoY*, *ExoT*, *ExoU*, *Apr*, *LasB*, *LasI*, *LasR*, *rhII* y *rhRI* presentes en cepas de *P. aeruginosa* aisladas del TRI de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica (casos) y procedentes de otros orígenes de infección (controles).

	<i>AlgD</i> N (%)	<i>AlgU</i> N (%)	<i>plcH</i> N (%)	<i>plcN</i> N (%)	<i>ExoS</i> N (%)	<i>ExoY</i> N (%)	<i>ExoT</i> N (%)	<i>ExoU</i> N (%)	<i>Apr</i> N (%)	<i>LasB</i> N (%)	<i>LasI</i> N (%)	<i>LasR</i> N (%)	<i>rhII</i> N (%)	<i>rhRI</i> N (%)
Controles	50 (100,0)	41 (82,0)	50 (100,0)	50 (100,0)	37 (74,0)	45 (90,0)	50 (100,0)	15 (30,0)	50 (100,0)	50 (100,0)	48 (96,0)	48 (96,0)	38 (76,0)	37 (74,0)
Casos	40 (100,0)	33 (82,5)	40 (100,0)	40 (100,0)	31 (77,5)	39 (97,5)	40 (100,0)	13 (32,5)	39 (97,5)	40 (100,0)	40 (100,0)	39 (97,5)	36 (90,0)	36 (90,0)
Total	90 (100,0)	74 (82,2)	90 (100,0)	90 (100,0)	68 (75,6)	84 (93,3)	90 (100,0)	28 (31,1)	89 (98,9)	90 (100,0)	88 (97,8)	87 (96,7)	74 (82,0)	73 (81,0)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genes de virulencia entre las cepas caso y las cepas control ($p > 0,05$) usando el test de Chi-cuadrado.

3.4. Ensayos de virulencia en modelo *in vivo* de *G. mellonella*.

Sólo se pudieron comprar en términos de virulencia en el modelo *in vivo* de *G. mellonella* 8 cepas de cada grupo. Sin embargo, a pesar del pequeño tamaño muestral se observó que las cepas aisladas del TRI de pacientes con NAVM eran menos virulentas que las aisladas de otros focos infecciosos ($p < 0,001$) (**figura 31**). La media de supervivencia para las cepas control fue de 16 horas con una DE de 1,7, mientras que para las cepas caso fue de 18 horas con una DE de 2,9.

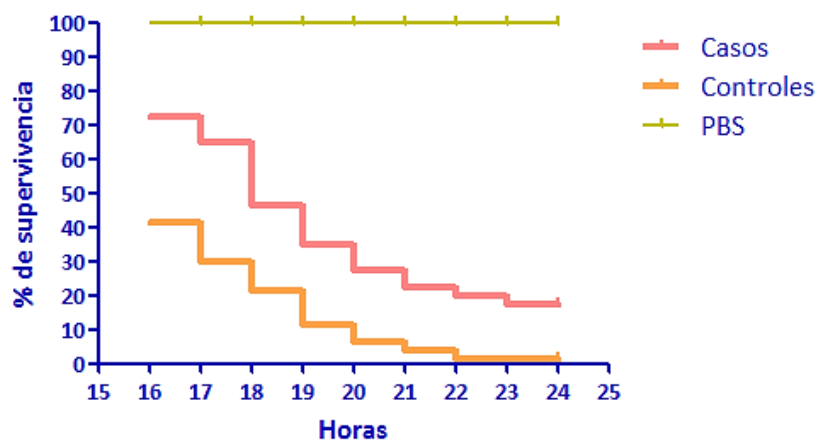
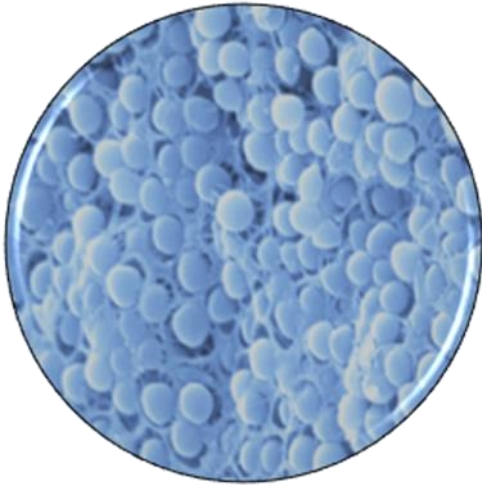


Figura 31. Porcentaje de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* tras ser infectadas con un inóculo de 10^3 ufc/ml de cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM (casos, rosa) frente a cepas de otros orígenes de infección (controles, naranja). PBS representa la supervivencia larvaria sin infección. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de las larvas infectadas con cepas control y cepas caso ($p < 0,001$).



DISCUSIÓN

El biofilm microbiano fue observado por primera vez por Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), quién, en el siglo 17 usando una muestra de su propia boca, describió la biopelícula como una comunidad de microorganismos rodeados por una ME (65).

Sin embargo, no fue hasta los años 70 cuando estos agregados comenzaron a tomar fuerza en el ámbito clínico (65). A día de hoy se sabe que el 65% de las infecciones se relacionan con la formación de un biofilm no solo bacteriano sino también fúngico (70). Al estar protegidos por una ME, los microorganismos contenidos en el biofilm son mucho menos susceptibles al ataque de agentes antimicrobianos y al ataque del propio sistema inmune, lo que conlleva a un alto porcentaje de fracaso en los tratamientos (18).

Las dos entidades más importantes relacionadas con la formación del biofilm sobre dispositivos médicos en pacientes ingresados en unidades como oncología, hematología o UCIs son la BRC y la NAVM. Debido a su alta morbi-mortalidad, sus altos costes asociados y las prolongadas estancias hospitalarias, hace necesario mejorar el diagnóstico, la prevención y tratamiento de estas infecciones.

Por ello, en esta tesis se ha pretendido profundizar particularmente en el tratamiento de la BRC y en el diagnóstico, prevención, y tratamiento de la NAVM. Se han intentado solucionar las actuales controversias que existen en el uso de etanol combinado con anticoagulante como solución de sellado de CVCs y se proponen ideas novedosas dentro del campo del diagnóstico rápido y tratamiento de la NAVM.

Aunque aún hacen falta varios estudios para demostrar la eficacia y la viabilidad de estas proposiciones en el ámbito clínico, nuestras ideas podrían contribuir a la disminución de la prevalencia de dichas infecciones, mejorando el manejo del tratamiento, disminuyendo los tiempos de diagnóstico, abaratando los costes que estas

enfermedades causan en el ambiente hospitalario y, por ende, mejorando el pronóstico de los pacientes que las sufren.

1. Diseño y validez en estudio *in vitro* de una solución de sellado de catéter idónea para erradicar el biofilm de diversas bacterias y levaduras con mínima concentración de etanol y de anticoagulante capaz de evitar la inactivación de la capacidad anti-trombótica del anticoagulante.

Los resultados demostraron que una solución formada por etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina administrada durante 72 horas es suficiente para reducir el 90% de la actividad metabólica del biofilm de cepas ATCC de 5 de los microorganismos más comúnmente causantes de BRC. Asimismo, en la validación de estos resultados con cepas clínicas causantes de BRC también se obtuvieron porcentajes >85% de reducción de la actividad metabólica del biofilm de las cepas. Sin embargo, en ambos estudios se demostró que, a los 3 días de haberse finalizado la terapia, las células sésiles presentes en el biofilm tuvieron una alta capacidad de recrecimiento.

Por otra parte, en el estudio de la eficacia de una solución de sellado de etanol en combinación con otro anticoagulante distinto a la heparina (enoxaparina), se demostró que éste afectaba negativamente a la actividad anti-biofilm del etanol, necesitándose concentraciones >40% para obtener reducciones del al menos el 90% de la actividad metabólica del biofilm.

La BRC es una infección relacionada con el biofilm que adquiere mucha atención por parte del personal sanitario debido a sus altos rangos de morbilidad y mortalidad (de hasta el 25%) y altos costes asociados (18,000 euros/episodio) (3, 5, 18, 142, 143). Las guías recomiendan la retirada del cateter cuando existe sospecha de BRC (7). Sin embargo, existen situaciones especiales como ausencia de una vía central alternativa o pacientes con aletraciones sanguíneas, en los que el recambio del catéter tiene más

riesgos que beneficios (7, 27, 35, 144). En estos casos, el manejo terapéutico se basa en el uso de soluciones de sellado de antibióticos, administradas a través de la luz del catéter, combinadas con tratamiento sistémico (6, 34, 145). En un estudio publicado recientemente por Freire y cols., el porcentaje de éxito de las soluciones antibióticas de sellado en pacientes oncológicos fue del 75,9% con una mejora en el pronóstico del paciente (146). Sin embargo, el abuso de los antibióticos está aumentando la aparición de cepas multi-R (36).

El etanol ha sido propuesto como una alternativa a las terapias de sellado con antibiótico debido a la ausencia de resistencias, su bajo coste, y a su accesibilidad (147). Asimismo, ha mostrado resultados muy prometedores en estudios clínicos con porcentajes de éxito de entre 71% y el 100% sin aparición de resistencias (148-151). Sin embargo, la mayoría de los estudios clínicos se han realizado con etanol al 70%, el cual ha demostrado tener varios efectos secundarios como náuseas, mareos, ruptura del lumen del catéter u oclusión del mismo (152-154). Por otro lado, también es necesario el uso combinado con un anticoagulante en terapias mayores a 24 horas. Sin embargo, su compatibilidad con el etanol está siendo discutida (155).

Nuestro estudio ha sido el primero en analizar los efectos de las soluciones de sellado con etanol al 25%, 40% y 70%, tanto solo como combinado con heparina, en una gran variedad de tiempos evaluando, asimismo, la capacidad de recrecimiento del biofilm en cepas ATCC de los principales microorganismos causantes de BRC. Al contrario que Hogan y cols., y Qu y cols., quienes observaron una reducción completa de la viabilidad microbiana de *S. aureus* y ECN tras terapias con etanol al 7,5% y 20%, respectivamente (156, 157), en este estudio se observó que concentraciones de etanol $\leq 25\%$ no eran

suficientes para reducir en más del 50% la actividad metabólica del biofilm de estas cepas. Por ello, hipotetizamos que las soluciones de etanol al 25% no deberían usarse como terapia de cierre debido a su baja eficacia y a las grandes diferencias que esta concentración a mostrado en varios estudios *in vitro*. Así mismo, en comparación con los controles positivos, se obtuvieron rangos más bajos de reducción de la actividad metabólica en los biofilms de *S. aureus* y de *S. epidermidis* que en el resto de microorganismos tras las terapias de sellado con etanol al 25% tanto solo como en combinación con la heparina, como se reportó en otros estudios (158, 159). Estas grandes diferencias probablemente se deban a la baja penetración que tiene el etanol a las células del biofilm debido al efecto protector de la ME. De esta manera, la concentración que llega a atacar a las células internas del biofilm es menor de la deseada y es probable que estas concentraciones subletales incrementen la transcripción del cluster que contiene los genes *ica*, responsables de la formación y crecimiento del biofilm de bacterias del género *Staphylococcus* (158-160).

Otro de los fenómenos que se describen en la literatura es la estimulación de la formación del biofilm en estafilococos por la heparina, la cual aumentaría la interacción entre células y reduciría la eficacia de las soluciones de etanol, como se muestra en este estudio. Ello sugerría que las soluciones de sellado compuestas solo de heparina no serían recomendables para el mantenimiento del catéter (161). Siguiendo en las líneas de Luther y cols., y Cincarova y cols. (158, 159), también observamos que concentraciones bajas de etanol no fueron eficaces en reducir la actividad metabólica de biofilm de *E. coli*. Este hecho concuerda con los hallazgos de Lim y cols. quienes observaron que, a concentraciones bajas de etanol, *E. coli* era capaz de inducir la

expresión de los curli aumentando la producción extracelular de amiloide y, por tanto, fortaleciendo la estructura comunitaria, mejorando la supervivencia (162).

Por otra parte, el presente estudio es el primero en aportar resultados sobre la eficacia de las soluciones de sellado de etanol en *E. faecalis*. Este microorganismo ha demostrado comportarse de la misma manera que *C. albicans*, ya que la reducción de la actividad metabólica alcanzó mejores porcentajes con concentraciones crecientes de etanol y en tiempos crecientes de terapia, demostrando que la actividad anti-biofilm del etanol es tiempo y concentración dependiente.

A pesar de que deben tenerse en cuenta diversas consideraciones, nuestros resultados son similares a los descritos en la literatura, donde soluciones de etanol al 40% han demostrado ser eficientes en erradicar el biofilm tanto fúngico como bacteriano. Sin embargo, en tiempos largos de exposición, es necesaria la adición de un anticoagulante para mantener las propiedades del catéter y prevenir la precipitación de proteínas (163). Por lo que nuestros resultados también demuestran que la combinación de etanol al 40% con 60 UI de heparina tiene propiedades anti-biofilm muy considerables, similares a las soluciones de etanol al 70% pero sin inactivación de la heparina y evitando los efectos secundarios del etanol a concentraciones altas.

Sin embargo, el tipo de anticoagulante usado también es un factor a tener en cuenta. El anticoagulante más usado en las soluciones de sellado es la heparina, tanto en su forma sin fraccionar como en sus formas de bajo peso molecular (164). La enoxaparina es la más representativa de las heparinas de bajo peso molecular y está reemplazando a las no fraccionadas debido a su fácil uso, y a su perfil farmacocinético predecible (165). Sin embargo, la literatura relacionada con su estabilidad en combinación con el etanol

es escasa. Calvet y cols. demostraron que la enoxaparina (400 UI/ml) era estable combinada con etanol al 40% y que esta solución sólo tenía un impacto marginal sobre la superficie del catéter (166). De acuerdo con estos resultados, Balestrino y cols. observaron que una solución de sellado compuesta por etanol al 40% y enoxaparina (400 UI/ml) erradicaba el biofilm de *S. aureus* y *C. albicans* (167). Formaron y trataron los biofilms en micro-fermentadores que contenían segmentos de catéteres de silicona y obtuvieron una reducción significativa (mediante recuento ufc) tras una terapia de 24 horas (167).

Sin embargo, nuestros resultados demostraron alteraciones en la actividad anti-biofilm del etanol al 40% en *S. aureus* y *E. faecalis* para el mismo tiempo de terapia. Probablemente la diferencia de metodología de ambos estudios explique las grandes diferencias encontradas en la supervivencia del biofilm de estos microorganismos. Sin embargo, aunque eficaz para *S. epidermidis*, *C. albicans*, y *E. coli*, la solución alcohólica al 40% combinada con enoxaparina no resultó ser más eficaz que la combinada con heparina sin fraccionar afectando de una manera muy negativa la actividad del etanol.

Otro de los puntos clave de la terapia de sellado es el tiempo de tratamiento. Con este estudio hemos demostrado que una solución de etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina aplicada durante 72 horas como solución de sellado es suficiente para reducir la actividad metabólica >90% de cepas ATCC causantes de BRC. Asimismo, esta terapia también fue eficaz en un gran número de representantes de cepas clínicas, como se ha descrito en la literatura. Öncü y cols. describieron la actividad anti-biofilm del etanol al 40% en cepas de *Candida* sp. (168). Usando fragmentos de catéteres de silicona de 1 cm, demostraron que aplicando el etanol al 40% durante 30 minutos se inhibió el

crecimiento de aislados clínicos de *C. albicans* en placas de agar Sabouraud (168). Aumentando el tiempo de exposición a esta solución a 4 horas, Peters y cols. consiguieron inhibir completamente la actividad metabólica de cepas prototipo de *C. albicans* y *S. aureus* usando sales de tatrazolio (XTT) como método de revelado (128). Adicionalmente, Chaudhury y cols. y Qu y cols. no recuperaron ninguna ufc de *S. aureus* o de ECN tras 1 hora de exposición a 40% de etanol (157, 169). Este efecto anti-biofilm también fue demostrado para bacilos gram negativos por Chambers y cols., que demostraron los efectos bactericidas del etanol a concentraciones comprendidas entre el 30% y el 90%, aplicado durante 8 horas en biofilms maduros de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (170).

A pesar de que nuestros resultados son satisfactorios en términos de reducción de la actividad metabólica, es imprescindible estudiar la posible capacidad que podrían tener estos microorganismos de recrecer tras la terapia. En las cepas ATCC observamos que los mejores porcentajes de inhibición del recrecimiento de estos microorganismos se obtuvieron tras 24 horas de haber finalizado la terapia. Sin embargo, cuando se examinó el recrecimiento tras 7 días de haber finalizado el tratamiento, todos los microorganismos fueron capaces de recrecer recuperando casi el 75% de su actividad metabólica. Nuestros resultados son similares a los obtenidos mediante el equipo de Peters, quienes describieron una inhibición completa del recrecimiento de *S. aureus* y *C. albicans* pasadas 24 horas de terminar la terapia con etanol al 30% y al 50% (128). Sin embargo, nosotros hemos demostrado que, con tiempos de recrecimientos más largos, los microorganismos son capaces de recuperar su actividad metabólica. Dicho fenómeno fue validado asimismo con cepas clínicas, donde observamos que incluso en recrecimientos cortos de 24 horas, los microorganismos que conforman el biofilm eran

capaces de crecer si no estaban sometidos a un tratamiento continuo. Esto implica que la capacidad de recrecer no solo depende del tipo de cepa y de la concentración de etanol utilizada, sino también del tiempo que se dejen recrecer después del tratamiento. Nuestros resultados sugieren que, aunque no metabólicamente activas, sí existen células viables que, tras un periodo condiciones óptimas serían capaces de recuperar su capacidad de recrecer causando infecciones persistentes, como se ha descrito previamente (171, 172). Por ejemplo, en las cepas clínicas de *E. coli*, se observó que la actividad metabólica se redujo en un 100% tras la terapia, pero la biomasa del biofilm alcanzó porcentajes de reducción del 95% exponiendo la presencia de este tipo de células. Este proceso también se observó en el resto de cepas, donde hubo diferencias sustanciales entre la reducción en la actividad metabólica y la biomasa. Así, aunque previamente nuestro equipo demostró que las técnicas de CV y XTT son complementarias para la caracterización de la formación del biofilm (173), ya que miden parámetros diferentes, el CV puede teñir células que no se pueden detectar por XTT, por ser metabólicamente inactivas.

Este fenómeno es comúnmente conocido como células viables pero no cultivables (CVNC) y representa un gran reto para los clínicos debido a los altos porcentajes de fracasos en los tratamientos que este tipo de células implica (96). Por ello, es probable que los cambios de pH y el estrés medioambiental a los que se somete el biofilm tras la exposición al etanol provoquen el cambio metabólico de estos microorganismos (174-176).

A pesar de todos nuestros hallazgos, nuestros estudios están sujetos a una serie de limitaciones. Primeramente, aunque el modelo en placa multi-pocillo es uno de los más

populares para testar y cuantificar varias muestras a la vez, está limitado por las grandes variaciones biológicas que tienen lugar, incluso entre pocillos con la misma muestra (177, 178). Asimismo, las placas multi-pocillo están compuestas por polipropileno y no de silicona (material utilizado en catéteres) afectando a la adhesión, formación y arquitectura del biofilm, lo que facilita más la adhesión microbiana a este tipo de material en comparación con la silicona (179, 180). Por ello, nuestros resultados muestran que la terapia de sellado con etanol al 40% en combinación con heparina es eficaz incluso en un material con altos porcentajes de formación de biofilm.

Por otra parte, no se realizó recuento de ufc, pero dado que las CVNC no se detectan mediante cultivo convencional, de haberlo hecho, no hubiera aportado ninguna información relevante.

Otra de las limitaciones viene dada por la naturaleza mono-microbiana del biofilm. A pesar de que la incidencia de biofilms polimicrobianos es baja (8,0%-17,0%) (181, 182), sería necesario evaluar la capacidad de esta terapia de erradicar biofilms polimicrobianos, teniendo en cuenta su relevancia clínica, sobre todo aquellos compuestos por especies de *Candida* sp. (183).

En esta primera parte de la tesis se ha demostrado que una solución de etanol al 40% combinado con 60UI de heparina aplicada como terapia de sellado durante 72 horas en un modelo *in vitro* reduce el biofilm bacteriano y fúngico. A pesar de no haber logrado erradicarlo por completo, nuestros resultados sugieren que esta solución podría ser una gran alternativa a las actuales soluciones antibióticas al menos para mantener el catéter hasta un posible cambio o fin de uso. Sin embargo, es necesaria la realización de

posteriores estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para mejorar la penetración del etanol en las capas internas del biofilm y erradicar las CVNC.

2. Estudio de la eficacia de la solución digestiva descontaminante como “terapia de sellado” en el espacio subglótico del tubo endotraqueal, comparando la viabilidad de diversas bacterias y la composición de su biofilm mediante tres técnicas diagnósticas *in vitro*.

Nuestros datos muestran en un modelo *in vitro* que la SDD es eficaz en prevenir la formación del biofilm y en eliminar un biofilm maduro sobre el espacio subglótico del tubo endotraqueal.

La NAVM sigue representando un gran reto en pacientes ingresados en UCIs con una incidencia de hasta el 24%, una mortalidad atribuible del 13% y aumentos en los costes hospitalarios de unos 30,000 euros por paciente (184, 185). Existen una gran variedad de medidas preventivas propuestas por la Sociedad de Epidemiología de Salud de América y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (53, 54, 186). La mayoría de estas medidas se basan principalmente en la descolonización de la superficie interna del TET. Sin embargo, se ha demostrado que el biofilm bacteriano también se puede formar en la superficie externa (187).

Bajo este fundamento, llevamos a cabo un modelo *in vitro* de intubación traqueal simulando la tráquea de un adulto, donde demostramos que la SDD se puede aplicar como terapia de sellado en el espacio subglótico, previniendo así la formación del biofilm en la superficie externa con una eficacia del 100% para las cepas *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E.coli* ATCC 25922, y *S. aureus* ATCC 29213.

Otros autores han propuesto otros procedimientos para prevenir la formación del biofilm en la NAVM. Machado y cols. han descrito recientemente una nueva manera de prevenir la formación del biofilm sobre la superficie del TET mediante la nanomodificación del polivinilo del que están hechos los TET con una lipasa fúngica (188, 189). Con estas modificaciones consiguieron reducir la colonización de *P. aeruginosa* en $2,7 \log_{10}$ (184). Sin embargo, no consiguieron una reducción total. En nuestro estudio no recuperamos ni células vivas ni cultivables tras la terapia de profilaxis con SDD. En otro estudio llevado a cabo por Wang y cols., se obtuvo una inhibición completa de la formación del biofilm de *P. aeruginosa* usando ondas ultrasónicas en un nuevo modelo de TET (190). Aunque las ondas ultrasónicas son una tecnología prometedora, actualmente suponen un alto coste. Asimismo, en un estudio previo de nuestro grupo demostramos que la terapia con SDD durante 5 días consecutivos era efectiva en reducir un biofilm preformado de *P. aeruginosa* en comparación con la terapia en dosis única (191). Por ello, era necesario estudiar la eficacia preventiva de este tratamiento en otros microorganismos.

P. aeruginosa, *S. aureus*, y *E. coli* son tres de los microorganismos más representativos de la NAVM con una incidencia del 13,1%, 28,3% y 6%, respectivamente (60). La literatura sobre la prevención de la colonización del TET es bastante amplia, pero nuestro estudio es el primero en probar este tipo de terapia sobre el biofilm de estos tres microorganismos con resultados muy exitosos en todos ellos.

Otro punto clave en el manejo de la NAVM es el tratamiento. Aunque las medidas preventivas han resultado ser muy eficaces, algunas bacterias son capaces de alcanzar la superficie del TET y formar un biofilm, lo que conlleva fracasos en los tratamientos y

cronicidad de la infección (47). En nuestro modelo nosotros hemos demostrado que la SDD redujo el biofilm maduro de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus*. A pesar de que el porcentaje de reducción de células vivas no alcanzó el 75% en *P. aeruginosa* y *E. coli*, el porcentaje de reducción de las ufc fue del 100%. Este hecho explicaría que podrían existir CVNC, al igual que en el estudio previo de BRC. Durante los 5 días de tratamiento con antibiótico, las bacterias están expuestas a altas dosis de antimicrobiano, lo que desencadenaría una respuesta adaptativa para intentar sobrevivir, conllevando una dificultad diagnóstica y terapéutica. Como se comenta en el estudio de Li y cols., el papel de las CVNC todavía está en discusión (96). Algunos autores hipotetizan que este tipo de células son un estado preliminar a la muerte y por ende, no tendrían ningún tipo de impacto clínico (96). Otros autores consideran que las CVNC tendrían la capacidad de “resucitar” como nosotros hemos demostrado previamente (96).

En el caso de *S. aureus* hubo que suplementar la SDD con vancomicina, siendo el porcentaje de erradicación del biofilm del 100%. En un estudio presentado por Fernández-Barat y cols., evaluaron la capacidad de la vancomicina, en comparación con el linezolid, para erradicar el biofilms de SARM formado sobre la superficie de TET de cerdos ventilados mecánicamente (138). Observaron que el linezolid i.v era estadísticamente más efectivo que la vancomicina, pero ningún de los dos conseguía eliminar completamente la biopelícula (138). Por estos hallazgos, es posible que la administración de linezolid intravenoso combinado con la terapia de sellado con SDD que nosotros proponemos, podría alcanzar muy buenos resultados *in vivo* para el tratamiento de la NAVM. Sin embargo, aunque en nuestro modelo no hemos encontrado indicios de la presencia de CVNC, habría que tener en consideración que

tanto la vancomicina como la daptomicina inducen significativamente la aparición de este fenómeno en *S. aureus* (192, 193).

Respecto a la aplicación clínica de nuestro procedimiento, Pneumatikos y cols. demostraron en un ensayo clínico que los casos de NAVM disminuían significativamente cuando se aplicaba de una forma continua, una infusión de SDD en el espacio subglótico de pacientes intubados en la unidad de traumatología (194). Sin embargo, esta aplicación continuada es más complicada de manejar en pacientes en UCIs. En este caso, nosotros proponemos que sería más cómodo y fácil usar un régimen de 30 minutos de sellado aplicado en cada turno de enfermería (cada 6 horas) inmediatamente después de la aplicación subglótica (consiguiendo un total de 2h/día de sellado). Asimismo, en nuestro modelo hemos demostrado que no existen evidencias de filtración de la SDD desde el espacio subglótico, por lo que nuestro procedimiento sería seguro para los pacientes. No obstante, dicho fenómeno deber ser estudiado en futuros ensayos clínicos junto con la monitorización constante de la presión del neumo-taponamiento a >20 cm H₂O, como recomiendan las guías (51).

Dentro de las limitaciones, a pesar de que nuestro modelo *in vitro* simula las condiciones del espacio subglótico de los TET durante la intubación del paciente, el hecho de que sea un modelo estático difiere de lo que realmente sucede en el paciente intubado. Por otro lado, no se usaron neutralizadores o inactivadores antes del cultivo, los cuales podrían limitar el crecimiento de bacterias en estado de CVNC, aunque no existe ningún consenso sobre el uso de neutralizadores en este tipo de células y las guías no contemplan el uso de estos agentes en muestras clínicas salvo en el caso de la descontaminación previa al procesamiento de muestras para cultivo de micobacterias (18,

96, 195). Otra de las limitaciones fue el bajo número de microorganismos testados. A pesar de que se testaron 3 de los microorganismos más representativos de NAVM en nuestra institución, nuestros resultados no podrían ser extrapolados a otras instituciones donde *P. aeruginosa*, *E. coli*, o *S. aureus* fueran agentes causales minoritarios de NAVM, y, por tanto, el modelo tendría que validarse con otras bacterias/hongos.

En conclusión, en este segundo estudio de la tesis se ha demostrado cómo la SDD usada en una terapia de sellado en el espacio subglótico del TET en modelo de simulación de intubación traqueal, previene la formación del biofilm bacteriano y erradica significativamente el biofilm maduro como medida de tratamiento de la NAVM.

3. Caracterización de virulencia de cepas de *P. aeruginosa* causantes de neumonía asociada a ventilación mecánica.

Nuestros resultados muestran que la NAVM causada por *P. aeruginosa* no está estrictamente relacionada con la producción de biofilm o la presencia de genes de virulencia específicos. Sin embargo, los aislados de NAVM no presentaron producción de piocianina tras 24 horas de incubación y resultaron ser menos virulentas que las cepas control en el modelo *in vivo* de *G. mellonella*.

Existen multitud de estudios que se basan en el manejo de la NAVM debido al impacto que tiene en el ámbito hospitalario (196-198). Sin embargo, solamente unos pocos estudios explican la patogénesis de la NAVM (199-201). Por ello, este es el primer estudio en caracterizar un gran número de cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM aisladas en varios hospitales de Europa contribuyendo al entendimiento de los mecanismos de virulencia de *P. aeruginosa* en la patogénesis de la NAVM.

P. aeruginosa se caracteriza por su capacidad de formar biofilms muy robustos, los cuales tienen un papel fundamental en muchas infecciones humanas como la fibrosis quística (FQ), heridas crónicas, otitis media crónica o infecciones relaciones con dispositivos médicos (202). Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la NAVM, como se ha explicado previamente, es la presencia del TET sobre el cual *P. aeruginosa* es capaz de formar biopelículas y, de esta forma, entrar al tracto respiratorio inferior causando la neumonía (47). En este estudio hemos demostrado que la alta producción de biomasa en el biofilm no sólo está implicada en la patogénesis de la NAVM, sino también en otro tipo de infecciones como ya describieron Rybtke y cols. (202). Asimismo, la mayoría de las cepas mostraron tener una actividad metabólica moderada o baja cuando crecieron en biofilms, lo que podría indicar que es una característica intrínseca de las biopelículas de *P. aeruginosa*. Esta característica confiere una resistencia intrínseca a los antibióticos, especialmente a antibióticos que actúan en procesos celulares asociados a la actividad metabólica, lo cual provoca que las infecciones causadas por *P. aeruginosa* sean difíciles de tratar (202, 203).

Otro de los factores más importantes en la virulencia de *P. aeruginosa* es la producción de pigmentos como la pioverdina o la piocianina (199). Las cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM se relacionaron con la no producción de piocianina y todas estas cepas secretaron pioverdina tras 24 horas de incubación en placa. La pioverdina es un sideróforo que quela iones los cuales son necesarios para la supervivencia de *P. aeruginosa* (199). El papel de la pioverdina podría explicar por qué es secretada por todas las cepas causantes de NAVM debido a que es necesaria para la formación del biofilm y, por ende, para la colonización del TET. Sin embargo, la piocianina es un compuesto redox involucrado en el daño del epitelio pulmonar y su

papel en la patogénesis del daño pulmonar ha sido ampliamente estudiado en pacientes con FQ (204, 205). En este estudio no observamos la producción de piocianina en las cepas causantes de NAVM y por ello hipotetizamos que la producción de pigmentos podría ser un proceso de dos pasos, debido a que se ha demostrado que la piocianina es esencial para la patogénesis de la neumonía (205). Primeramente, la pioverdina sería necesaria para la formación de la biopelícula y colonización del TET y por ello podría ser la primera en secretarse, y después, la piocianina podría sintetizarse pasar causar el daño pulmonar y la neumonía.

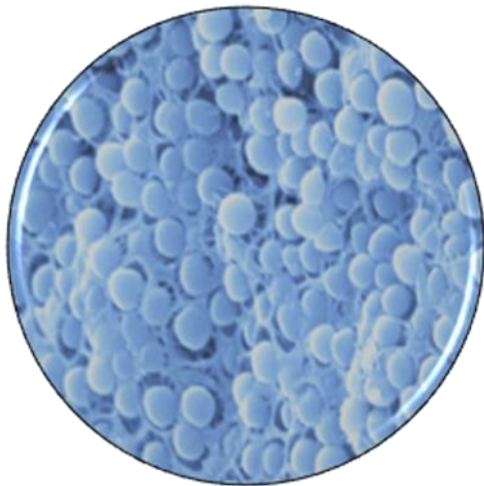
Respecto a los genes de virulencia, la formación del biofilm está regulada por multitud de genes entre los que destacan *AlgR* (regulador de *AlgU* y *AlgD*), *Psl* y *Pel* los cuales describen la mucosidad y la robustez de la ME (203). En este estudio observamos que la presencia de los genes *AlgD* y *AlgU*, ambos implicados en la producción de alginato, es diferente. *AlgD* se encontraba presente en todas las cepas testadas, mientras que solo un 82,2% de las cepas poseían el gen *AlgU*. *AlgU* es un factor sigma extra-citoplasmático que, normalmente se encuentra secuestrado en la membrana plasmática y, en condiciones concretas es liberado y activa la sobreproducción de alginato (206). La función de este factor de virulencia es bien conocida en la patogénesis de la FQ contribuyendo al fenotipo mucoso de las cepas. Sin embargo, aunque se ha descrito que *AlgU* también tiene un papel importante en la formación de biopelículas en cepas no mucosas (207), nuestros resultados sugieren que *AlgD* tiene mayor importancia que *AlgU* en la formación del biofilm de *P. aeruginosa* en casi todas las infecciones. Sin embargo, las cepas que no poseían el gen *AlgU* producían una cantidad baja o moderada de biomasas en sus biopelículas por lo que, es posible que *AlgU* sea un gen importante en la formación de biopelículas en la NAVM.

A parte de la producción de biopelículas, los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa* son las elastasas, fosfolipasas C, proteasa A, exotoxinas y citotoxinas, el flagelo y los pili y el sistema de regulación de quorum-sensing, el cual, a su vez, regula la transcripción tanto de los genes de virulencia como de la formación del biofilm (208). Aunque el papel de todas estas proteínas en el daño pulmonar es bien conocido (131, 209), la importancia de estos factores de virulencia en la NAVM es desconocida. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la presencia de estos genes de virulencia entre las cepas casos y controles. Por ello, nuestros resultados corroboran la hipótesis de Wolfgang y cols. poniendo de manifiesto la gran conservación que existe en el genoma de *P. aeruginosa* independientemente del origen (210).

Finalmente, evaluamos la virulencia de todas estas cepas en un modelo *in vivo* de *G. mellonella* por su extendido uso en ensayos de virulencia de multitud de microorganismos debido a las ventajas que proporciona (211). Las cepas causantes de NAVM resultaron ser menos virulentas que las aisladas de otro tipo de infecciones, como ya describieron Wang y cols. en un brote de NAVM en un hospital de China (212), aunque la presencia de los genes de virulencia fuera similar en los dos grupos de cepas. Por ello, es probable que la virulencia esté controlada a nivel transcripcional. Nuestros resultados sugieren que dependiendo del lugar de infección, particularmente en el pulmón durante la NAVM, la metilación de ciertos genes de virulencia así como la mutación en genes del QS, como describieron Köhler y cols., podría contribuir en gran medida a la adaptación de la bacteria al ambiente (213). Por ello, una alternativa para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la NAVM podría recaer en el desarrollo de un exhaustivo perfil epigenético de las cepas causantes de NAVM. Aunque este estudio proporciona información relevante sobre la distribución de muchos genes de virulencia en una gran

cantidad de cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM aisladas en diferentes hospitales de España y de Italia, tiene ciertas limitaciones. La más importante es el pequeño número de cepas que se pudieron comparar en el modelo *in vivo* de *G. mellonella* debido a problemas con el suministro de las larvas. Sin embargo, a pesar de que solo se evaluaron 8 cepas en cada grupo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Por ello, el aumento del tamaño de la muestra solo hubiera incrementado el poder estadístico.

En conclusión, hemos demostrado que la virulencia y la patogénesis de *P. aeruginosa* en NAVM no depende de la presencia de genes de virulencia o de la formación de biofilm, sino de la regulación de todos estos genes durante la infección, la cual disminuye la virulencia de estas cepas *in vivo*. Sería necesaria la realización de futuros estudios para elucidar cómo se regula la virulencia durante la NAVM y, de esta manera, mejorar el diagnóstico y el tratamiento de esta entidad.

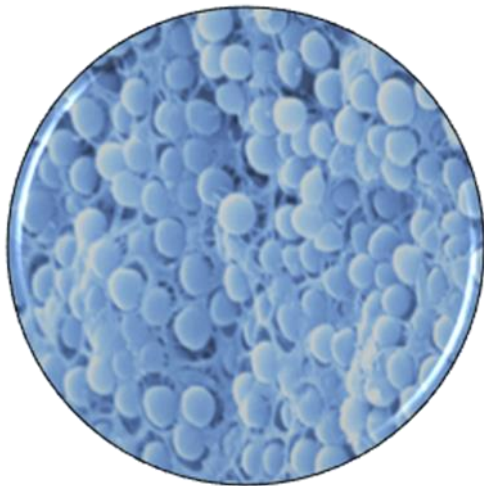


CONCLUSIONES

1. Etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina es la concentración mínima capaz de erradicar en más de un 90% la actividad metabólica de cepas ATCC de microorganismos causantes de BRC (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* y *C. albicans*) en un régimen de 72 horas.
2. El etanol al 40% no altera la actividad anti-trombótica de la heparina en soluciones de sellado aplicadas durante 72 horas.
3. La enoxaparina afecta negativamente a la actividad anti-biofilm del etanol y, por tanto, no se podría usar como anticoagulante en soluciones de sellado con etanol.
4. La solución de sellado compuesta por 40% de etanol combinado con 60 UI de heparina también es efectiva en reducir >85% la actividad metabólica de cepas clínicas causantes de BRC.
5. Tanto las cepas ATCC como las cepas clínicas de BRC son capaces de recrecer a los 7 días tras 3 días de la finalización de la terapia de sellado con etanol al 40% combinado con 60 UI de heparina.
6. El uso de la SDD como solución de sellado en el espacio subglótico de un modelo *in vitro* de NAVM, previene y erradica completamente el biofilm de *E. coli* y *S. aureus*. Asimismo, previene la formación del biofilm de *P. aeruginosa* y es capaz de erradicar hasta el 60% de las células vivas del biofilm preformado.
7. La virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM no depende ni de la alta producción de biofilm, ni de la producción de pigmentos, ni de la

presencia de ciertos genes de virulencia en su genoma. Sin embargo, estas cepas producen pioverdina y no piocianina tras 24 horas de cultivo.

8. Las cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAVM se caracterizan por una virulencia disminuida en modelo *in vivo* de *G. mellonella*.



BIBLIOGRAFÍA

1. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2017;125(4):365-75.
2. Ferrer C, Almirante B. Infecciones relacionadas con el uso de los catéteres vasculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2014. p. 115-24.
3. Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*. 2014;4(2):162-7.
4. Rupp ME, Majorant D. Prevention of Vascular Catheter-Related Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(4):853-68.
5. Riu M, Terradas R, Sala M, Comas M, Knobel H, Grau S, et al. [Costs associated with nosocomial bacteraemias in a University Hospital]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(3):137-42.
6. Aldea Mansilla C, Gracia Ahufinger I, Guembe Ramirez M, Martinez Alcorcón J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares. 2018. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2018.
7. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):1-45.
8. Holroyd JL, Vasilopoulos T, Rice MJ, Rand KH, Fahy BG. Incidence of central venous catheter hub contamination. *J Crit Care*. 2017;39:162-8.

9. Ferretti G, Mandala M, Di Cosimo S, Moro C, Curigliano G, Barni S. Catheter-related bloodstream infections, part I: pathogenesis, diagnosis, and management. *Cancer Control*. 2002;9(6):513-23.
10. Solana MJ, Botrán M, Bustinza A. Infecciones nosocomiales (I). Infección por catéter. *Anales de Pediatría Continuada* 2010. p. 167-73.
11. Shah H, Bosch W, Thompson KM, Hellinger WC. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection. *The Neurohospitalist*. 2013;3(3):144-51.
12. Bouza E, Burillo A, Munoz P. Empiric therapy for intravenous central line infections and nosocomially-acquired acute bacterial endocarditis. *Crit Care Clin*. 2008;24(2):293-312, viii-ix.
13. Rodriguez-Creixems M, Munoz P, Martin-Rabadan P, Cercenado E, Guembe M, Bouza E. Evolution and aetiological shift of catheter-related bloodstream infection in a whole institution: the microbiology department may act as a watchtower. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):845-51.
14. Goede MR, Coopersmith CM. Catheter-Related Bloodstream Infection. *Surgical Clinics*. 89(2):463-74.
15. (GEIDI) GdedIIAaDI. Recomendaciones de prevención y manejo de la bacteriemia relacionada con el catéter (BRC). Hospital General Universitario Gregorio Marañón: Comité de infecciones, higiene y política de antibióticos; 2017. p. 1-8.
16. Cercenado E, Ena J, Rodriguez-Creixems M, Romero I, Bouza E. A conservative procedure for the diagnosis of catheter-related infections. *Arch Intern Med*. 1990;150(7):1417-20.

17. Guembe M, Perez-Granda MJ, Cruces R, Martin-Rabadan P, Bouza E. Cultures of Needleless Connectors Are Useful for Ruling Out Central Venous Catheter Colonization. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2068-71.
18. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21 Suppl 1:S1-25.
19. Guembe M, Rodriguez-Creixems M, Sanchez-Carrillo C, Perez-Parra A, Martin-Rabadan P, Bouza E. How many lumens should be cultured in the conservative diagnosis of catheter-related bloodstream infections? *Clin Infect Dis*. 2010;50(12):1575-9.
20. Park KH, Lee MS, Lee SO, Choi SH, Sung H, Kim MN, et al. Diagnostic usefulness of differential time to positivity for catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2566-72.
21. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet*. 1999;354(9184):1071-7.
22. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*. 1977;296(23):1305-9.
23. Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: Critical level of quantitative tip cultures. *Archives of Internal Medicine*. 1987;147(5):873-7.

24. Sherertz RJ, Raad II, Belani A, Koo LC, Rand KH, Pickett DL, et al. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1990;28(1):76-82.
25. Guembe M, Martín-Rabadán P, Echenagusia A, Camúñez F, Rodríguez-Rosales G, Simó G, et al. How Should Long-Term Tunneled Central Venous Catheters Be Managed in Microbiology Laboratories in Order To Provide an Accurate Diagnosis of Colonization? *Journal of Clinical Microbiology.* 2012;50(3):1003-7.
26. Guembe M, Perez-Parra A, Gomez E, Sanchez-Luna M, Bustinza A, Zamora E, et al. Impact on knowledge and practice of an intervention to control catheter infection in the ICU. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(10):2799-808.
27. O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clinical infectious diseases.* 2011;52(9):e162-e93.
28. Lorente L, Jimenez A, Iribarren JL, Jimenez JJ, Martin MM, Mora ML. The micro-organism responsible for central venous catheter related bloodstream infection depends on catheter site. *Intensive Care Med.* 2006;32(9):1449-50.
29. Chong HY, Lai NM, Apisarnthanarak A, Chaiyakunapruk N. Comparative Efficacy of Antimicrobial Central Venous Catheters in Reducing Catheter-Related Bloodstream Infections in Adults: Abridged Cochrane Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Clin Infect Dis.* 2017;64(suppl_2):S131-s40.

30. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):510-43.
31. Raad I, Mohamed JA, Reitzel RA, Jiang Y, Raad S, Al Shuaibi M, et al. Improved antibiotic-impregnated catheters with extended-spectrum activity against resistant bacteria and fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):935-41.
32. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infection and Drug Resistance.* 2014;7:343-63.
33. Bohlke M, Uliano G, Barcellos FC. Hemodialysis catheter-related infection: prophylaxis, diagnosis and treatment. *J Vasc Access.* 2015;16(5):347-55.
34. Chaves F, Garnacho-Montero J, Del Pozo JL, Bouza E, Capdevila JA, de Cueto M, et al. Executive summary: Diagnosis and Treatment of Catheter-Related Bloodstream Infection: Clinical Guidelines of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) and the Spanish Society of Intensive Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(2):112-9.
35. Raad I, Chaftari AM, Zakhour R, Jordan M, Al Hamal Z, Jiang Y, et al. Successful Salvage of Central Venous Catheters in Patients with Catheter-Related or Central Line-Associated Bloodstream Infections by Using a Catheter Lock Solution Consisting of Minocycline, EDTA, and 25% Ethanol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3426-32.
36. Vassallo M, Dunais B, Roger PM. Antimicrobial lock therapy in central-line associated bloodstream infections: a systematic review. *Infection.* 2015;43(4):389-98.

37. Kalanuria AA, Ziai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Critical care* (London, England). 2014;18(2):208.
38. Charles MP, Kali A, Easow JM, Joseph NM, Ravishankar M, Srinivasan S, et al. Ventilator-associated pneumonia. *Australas Med J*. 2014;7(8):334-44.
39. Diaz E, Lorente L, Valles J, Rello J. Neumonía asociada a la ventilación mecánica. *Medicina Intensiva*. 2010;34:318-24.
40. Li Bassi G, Senussi T, Aguilera Xiol E. Prevention of ventilator-associated pneumonia. *Current opinion in infectious diseases*. 2017;30(2):214-20.
41. Alvarez-Lerma F, Palomar-Martinez M, Sanchez-Garcia M, Martinez-Alonso M, Alvarez-Rodriguez J, Lorente L, et al. Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia: The Multimodal Approach of the Spanish ICU "Pneumonia Zero" Program. *Crit Care Med*. 2018;46(2):181-8.
42. Bassi GL, Ferrer M, Marti JD, Comaru T, Torres A. Ventilator-associated pneumonia. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2014;35(4):469-81.
43. Bouza E, Martinez-Alarcon J, Maseda E, Palomar M, Zaragoza R, Perez-Granda MJ, et al. Quality of the aetiological diagnosis of ventilator-associated pneumonia in Spain in the opinion of intensive care specialists and microbiologists. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(3):153-64.
44. de Miguel-Diez J, Lopez-de-Andres A, Hernandez-Barrera V, Jimenez-Trujillo I, Mendez-Bailon M, Miguel-Yanes JM, et al. Decreasing incidence and mortality among hospitalized patients suffering a ventilator-associated pneumonia: Analysis of the

- Spanish national hospital discharge database from 2010 to 2014. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(30):e7625.
45. Oliveira J, Zagalo C, Cavaco-Silva P. Prevention of ventilator-associated pneumonia. *Revista portuguesa de pneumologia*. 2014;20(3):152-61.
 46. Waters B, Muscedere J. A 2015 Update on Ventilator-Associated Pneumonia: New Insights on Its Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep*. 2015;17(8):496.
 47. Fernandez-Barat L, Torres A. Biofilms in ventilator-associated pneumonia. *Future Microbiol*. 2016.
 48. Chastre J, Luyt C-E. 34 - Ventilator-Associated Pneumonia A2 - Broaddus, V. Courtney. In: Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, Nadel JA, et al., editors. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016. p. 583-92.e5.
 49. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir Care*. 2005;50(6):725-39; discussion 39-41.
 50. Nair GB, Niederman MS. Ventilator-associated pneumonia: present understanding and ongoing debates. *Intensive Care Med*. 2015;41(1):34-48.
 51. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(4):388-416.

52. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(5 Pt 1):1121-9.
53. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2016;63(5):e61-e111.
54. Klompas M, Branson R, Eichenwald EC, Greene LR, Howell MD, Lee G, et al. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia in acute care hospitals: 2014 update. *Infection control and hospital epidemiology.* 2014;35 Suppl 2:S133-54.
55. Plantinga NL, de Smet A, Oostdijk EAN, de Jonge E, Camus C, Krueger WA, et al. Selective digestive and oropharyngeal decontamination in medical and surgical ICU patients: individual patient data meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(5):505-13.
56. Silvestri L, van Saene HK, Petros AJ. Selective digestive tract decontamination in critically ill patients. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(8):1113-29.
57. Perez-Granda MJ, Barrio JM, Hortal J, Burillo A, Munoz P, Bouza E. Impact of selective digestive decontamination without systemic antibiotics in a major heart surgery intensive care unit. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018.
58. Bouza E, Burillo A. Advances in the prevention and management of ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22(4):345-51.

59. Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, Veremakis C, Kerr KM, Margolis BD, et al. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. *Jama*. 2008;300(7):805-13.
60. Roberts KL, Micek ST, Juang P, Kollef MH. Controversies and advances in the management of ventilator associated pneumonia. *Expert Rev Respir Med*. 2017;11(11):875-84.
61. Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Rosenthal KS. *Medical microbiology*. 6th ed. ed. Philadelphia, Pa: Mosby Elsevier; 2009.
62. Metersky ML, Kalil AC. New guidelines for nosocomial pneumonia. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2017;23(3):211-7.
63. Marañón CdlyPdAdHGUG. Recomendaciones sobre la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) en adultos. 2018. p. 1-7.
64. Wood GC, Swanson JM. An Update on Aerosolized Antibiotics for Treating Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Pneumonia in Adults. *Ann Pharmacother*. 2017;51(12):1112-21.
65. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*. 2017;125(4):272-5.
66. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.
67. Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol*. 2016;7:592.

68. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017;43(3):313-51.
69. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563-75.
70. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2017.
71. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2010;22(1):2-16.
72. Hoiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog Dis*. 2014;70(3):205-11.
73. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2017.
74. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-55.
75. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4):a010306.
76. Sekharan RT. Biofilm-A review. *World Journal Of Pharmaceutical Research* 2017. p. 1778-90.

77. Muhsin J, Ufaq T, Tahir H, Saadia A. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* 2015. p. 1-13.
78. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 2007;5(11):e307.
79. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493-512.
80. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):7-10.
81. Payne DE, Boles BR. Emerging interactions between matrix components during biofilm development. *Curr Genet.* 2016;62(1):137-41.
82. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-33.
83. Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, et al. Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *PLoS ONE.* 2009;4(6):e5822.
84. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2016;60(1):544-53.
85. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1387-92.

86. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:677-701.
87. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(1):51-65.
88. Rodney MD. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerging Infectious Disease journal.* 2001;7(2):277.
89. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108.
90. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 2015;64(Pt 4):323-34.
91. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence.* 2013;4(3):223-9.
92. nsch GM. Host Defence against Bacterial Biofilms: "Mission Impossible"? *ISRN Immunology.* 2012;2012:17.
93. Roilides E, Simitsopoulou M, Katragkou A, Walsh TJ. How Biofilms Evade Host Defenses. *Microbiol Spectr.* 2015;3(3).
94. Del pozo JL, Díez M, Guinea J, Marciá MD. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. *Procedimientos en Microbiología Clínica de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2017.
95. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci.* 2015;7(1):1-7.

96. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014;5:258.
97. Xu Y, Larsen LH, Lorenzen J, Hall-Stoodley L, Kikhney J, Moter A, et al. Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections. *Apmis.* 2017;125(4):289-303.
98. Beloin C, Renard S, Ghigo JM, Lebeaux D. Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol.* 2014;18:61-8.
99. De Prijck K, De Smet N, Rymarczyk-Machal M, Van Driessche G, Devreese B, Coenye T, et al. *Candida albicans* biofilm formation on peptide functionalized polydimethylsiloxane. *Biofouling.* 2010;26(3):269-75.
100. Desrousseaux C, Sautou V, Descamps S, Traore O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *J Hosp Infect.* 2013;85(2):87-93.
101. Bazaka K, Jacob MV, Crawford RJ, Ivanova EP. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta Biomater.* 2011;7(5):2015-28.
102. Bazaka K, Jacob MV, Crawford RJ, Ivanova EP. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95(2):299-311.
103. Bazaka K, Crawford RJ, Ivanova EP. Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness? *Biotechnol J.* 2011;6(9):1103-14.
104. Diaz C, Schilardi PL, Salvarezza RC, de Mele MF. Nano/microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces. *Langmuir.* 2007;23(22):11206-10.

105. Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive reviews*2015. p. 491-509.
106. Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol*. 2008;9(4):261-6.
107. Oliveira A, Ribeiro HG, Silva AC, Silva MD, Sousa JC, Rodrigues CF, et al. Synergistic Antimicrobial Interaction between Honey and Phage against *Escherichia coli* Biofilms. *Front Microbiol*. 2017;8:2407.
108. Chhibber S, Bansal S, Kaur S. Disrupting the mixed-species biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO using bacteriophages alone or in combination with xylitol. *Microbiology*. 2015;161(7):1369-77.
109. Zhang G, Zhao Y, Paramasivan S, Richter K, Morales S, Wormald PJ, et al. Bacteriophage effectively kills multidrug resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017.
110. Waters EM, Neill DR, Kaman B, Sahota JS, Clokie MRJ, Winstanley C, et al. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax*. 72. England: Published by the BMJ Publishing Group Limited. For permission to use (where not already granted under a licence) please go to <http://www.bmj.com/company/products-services/rights-and-licensing/>. 2017. p. 666-7.
111. Pires DP, Melo L, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol*. 2017;39:48-56.

112. Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(4):523-30.
113. Geilich BM, Gelfat I, Sridhar S, van de Ven AL, Webster TJ. Superparamagnetic iron oxide-encapsulating polymersome nanocarriers for biofilm eradication. *Biomaterials.* 2017;119:78-85.
114. Mihu MR, Cabral V, Pattabhi R, Tar MT, Davies KP, Friedman AJ, et al. Sustained Nitric Oxide-Releasing Nanoparticles Interfere with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Adhesion and Biofilm Formation in a Rat Central Venous Catheter Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(1).
115. Forier K, Raemdonck K, De Smedt SC, Demeester J, Coenye T, Braeckmans K. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release.* 2014;190:607-23.
116. Ramanathan S, Ravindran D, Arunachalam K, Arumugam VR. Inhibition of quorum sensing-dependent biofilm and virulence genes expression in environmental pathogen *Serratia marcescens* by petroselinic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2017.
117. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 2014;18:96-104.
118. Brackman G, Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr Pharm Des.* 2015;21(1):5-11.
119. Li Y-H, Tian X. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors (Basel, Switzerland).* 2012;12(3):2519-38.
120. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:165-99.

121. Valentini M, Filloux A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem*. 2016;291(24):12547-55.
122. Ha DG, O'Toole GA. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2):Mb-0003-2014.
123. Caly DL, Bellini D, Walsh MA, Dow JM, Ryan RP. Targeting cyclic di-GMP signalling: a strategy to control biofilm formation? *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):12-24.
124. Alvarez-Moreno CA, Valderrama-Beltran SL, Rosenthal VD, Mojica-Carreno BE, Valderrama-Marquez IA, Matta-Cortes L, et al. Multicenter study in Colombia: Impact of a multidimensional International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) approach on central line-associated bloodstream infection rates. *Am J Infect Control*. 2016;44(11):e235-e41.
125. Arthur LE, Kizor RS, Selim AG, van Driel ML, Seoane L. Antibiotics for ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;10:Cd004267.
126. Yousif A, Jamal MA, Raad I. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;830:157-79.
127. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
128. Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):74-82.
129. Rane HS, Bernardo SM, Walraven CJ, Lee SA. *In vitro* analyses of ethanol activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4487-9.

130. Schnabel RM, Scholte JB, Van Der Velden KE, Roekaerts PM, Bergmans DC. Ventilator-associated pneumonia rates after introducing selective digestive tract decontamination. *Infectious diseases (London, England)*. 2015;47(9):650-3.
131. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013;67(3):159-73.
132. Micek ST, Kollef MH, Torres A, Chen C, Rello J, Chastre J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of pneumonia classification. *Infection control and hospital epidemiology*. 2015;36(10):1190-7.
133. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of medical microbiology*. 2004;53(Pt 1):73-81.
134. Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *International journal of molecular epidemiology and genetics*. 2014;5(3):125-34.
135. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157-65.
136. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2007;115(8):891-9.

137. Carter EL, Duguid A, Ercole A, Matta B, Burnstein RM, Veenith T. Strategies to prevent ventilation-associated pneumonia: the effect of cuff pressure monitoring techniques and tracheal tube type on aspiration of subglottic secretions: an in-vitro study. *European journal of anaesthesiology*. 2014;31(3):166-71.
138. Fernández-Barat L, Li Bassi G, Ferrer M, Bosch A, Calvo M, Vila J, et al. Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):309-17.
139. Ullah W, Qasim M, Rahman H, Jie Y, Muhammad N. Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2017;80(3):173-7.
140. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2014;16(10):e15722.
141. Benthall G, Touzel RE, Hind CK, Titball RW, Sutton JM, Thomas RJ, et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(5):538-45.
142. Rosenblatt J, Reitzel R, Dvorak T, Jiang Y, Hachem RY, Raad, II. Glyceryl trinitrate complements citrate and ethanol in a novel antimicrobial catheter lock solution to eradicate biofilm organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3555-60.

143. Bell T, O'Grady NP. Prevention of Central Line-Associated Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2017;31(3):551-9.
144. Pittiruti M, Bertoglio S, Scoppettuolo G, Biffi R, Lamperti M, Dal Molin A, et al. Evidence-based criteria for the choice and the clinical use of the most appropriate lock solutions for central venous catheters (excluding dialysis catheters): a GAVeCeLT consensus. *J Vasc Access.* 2016;17(6):453-64.
145. Suzuki M, Satoh N, Nakamura M, Horita S, Seki G, Moriya K. Bacteremia in hemodialysis patients. *World Journal of Nephrology.* 2016;5(6):489-96.
146. Freire MP, Pierrotti LC, Zerati AE, Benites L, da Motta-Leal Filho JM, Ibrahim KY, et al. Role of Lock Therapy for Long-Term Catheter-Related Infections by Multidrug-Resistant Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9).
147. Maiefski M, Rupp ME, Hermsen ED. Ethanol lock technique: review of the literature. *Infection control and hospital epidemiology.* 2009;30(11):1096-108.
148. Tan M, Lau J, Guglielmo BJ. Ethanol locks in the prevention and treatment of catheter-related bloodstream infections. *The Annals of pharmacotherapy.* 2014;48(5):607-15.
149. Rajpurkar M, McGrath E, Joyce J, Boldt-MacDonald K, Chitlur M, Lusher J. Therapeutic and prophylactic ethanol lock therapy in patients with bleeding disorders. *Haemophilia.* 2014;20(1):52-7.
150. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147-79.
151. Cullis PS, Keene DJ, Zaman A, Barker C, Govan L, Minford J. Chemical stability of heparin, isopropanol, and ethanol line lock solutions. *J Pediatr Surg.* 2015;50(2):315-9.

152. Perez-Granda MJ, Barrio JM, Munoz P, Hortal J, Rincon C, Rabadan PM, et al. Ethanol lock therapy (E-Lock) in the prevention of catheter-related bloodstream infections (CR-BSI) after major heart surgery (MHS): a randomized clinical trial. *PLoS One*. 2014;9(3):e91838.
153. Mermel LA, Alang N. Adverse effects associated with ethanol catheter lock solutions: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(10):2611-9.
154. Mokha JS, Davidovics ZH, Samela K, Emerick K. Effects of Ethanol Lock Therapy on Central Line Infections and Mechanical Problems in Children With Intestinal Failure. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2016.
155. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infection and drug resistance*. 2014;7:343-63.
156. Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. *In Vitro* Approach for Identification of the Most Effective Agents for Antimicrobial Lock Therapy in the Treatment of Intravascular Catheter-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(5):2923-31.
157. Qu Y, Istivan TS, Daley AJ, Rouch DA, Deighton MA. Comparison of various antimicrobial agents as catheter lock solutions: preference for ethanol in eradication of coagulase-negative staphylococcal biofilms. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 4):442-50.
158. Cincarova L, Polansky O, Babak V, Kulich P, Kralik P. Changes in the Expression of Biofilm-Associated Surface Proteins in *Staphylococcus aureus* Food-Environmental Isolates Subjected to Sublethal Concentrations of Disinfectants. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4034517.

159. Luther MK, Bilida S, Mermel LA, LaPlante KL. Ethanol and Isopropyl Alcohol Exposure Increases Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infectious Diseases and Therapy*. 2015;4(2):219-26.
160. Korem M, Gov Y, Rosenberg M. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb Pathog*. 2010;48(2):74-84.
161. Shanks RMQ, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL, et al. Heparin Stimulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *Infection and Immunity*. 2005;73(8):4596-606.
162. Lim JY, May JM, Cegelski L. Dimethyl sulfoxide and ethanol elicit increased amyloid biogenesis and amyloid-integrated biofilm formation in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(9):3369-78.
163. Liu J, Wang Ca, Zhao H, Zhang J, Ma J, Hou Y, et al. Anticoagulant therapies versus heparin for the prevention of hemodialysis catheter-related complications: systematic review and meta-analysis of prospective randomized controlled trials. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(8):11985-95.
164. Goossens GA. Flushing and Locking of Venous Catheters: Available Evidence and Evidence Deficit. *Nursing Research and Practice*. 2015;2015:12.
165. Merli GJ, Groce JB. Pharmacological and clinical differences between low-molecular-weight heparins: implications for prescribing practice and therapeutic interchange. *P T*. 2010;35(2):95-105.
166. Calvet L, Piot M, Lartigue C, Souweine B, Tardy-Poncet B. Anticoagulant properties of enoxaparin 400 IU/mL-40 % ethanol catheter lock solution. *Springerplus*. 2015;4:746.

167. Balestrino D, Quintana M, Charbonnel N, Forestier C, Lartigue C, Souweine B. Compatibility of Injectable Anticoagulant Agents in Ethanol; *In Vitro* Antibiofilm Activity and Impact on Polyurethane Catheters of Enoxaparin 400 U/mL in 40% v/v Ethanol. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159475.
168. Oncu S. Optimal dosage and dwell time of ethanol lock therapy on catheters infected with *Candida* species. *Clin Nutr*. 2014;33(2):360-2.
169. Chaudhury A, Rangineni J, B V. Catheter lock technique: *in vitro* efficacy of ethanol for eradication of methicillin-resistant staphylococcal biofilm compared with other agents. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):305-8.
170. Chambers ST, Peddie B, Pithie A. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. *J Hosp Infect*. 2006;63(2):193-6.
171. Orruno M, Kaberdin VR, Arana I. Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(3):45.
172. E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):14790-801.
173. Alonso B, Lucio J, Perez-Granda MJ, Cruces R, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, et al. Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*? *J Microbiol Methods*. 2016.
174. Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol*. 2001;91(6):1095-102.

175. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health*. 2014;2:103.
176. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, et al. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(7):E259-61.
177. Coenye T, Nelis HJ. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2010;83(2):89-105.
178. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*. 2013;2(2):288-356.
179. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2009;11(8-9):753-61.
180. da Silva Meira QG, de Medeiros Barbosa I, Alves Aguiar Athayde AJ, de Siqueira-Júnior JP, de Souza EL. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*. 2012;25(2):469-75.
181. Nielsen XC, Chen M, Hellesøe A-MB, Jeppesen PB, Gyldenlykke J, Tvede M, et al. Etiology and Epidemiology of Catheter Related Bloodstream Infections in Patients Receiving Home Parenteral Nutrition in a Gastromedical Center at a Tertiary Hospital in Denmark. *The Open Microbiology Journal*. 2012;6:98-101.

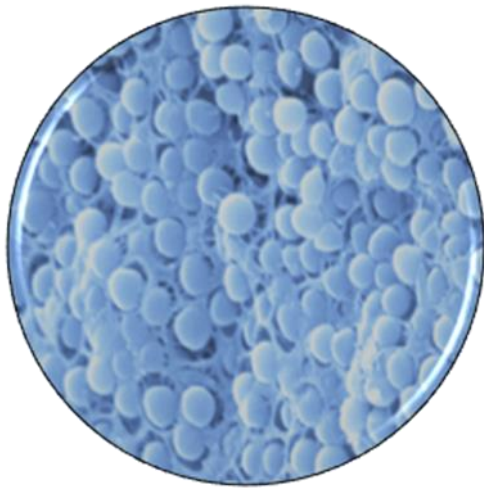
182. Strasheim W, Kock MM, Ueckermann V, Hoosien E, Dreyer AW, Ehlers MM. Surveillance of catheter-related infections: the supplementary role of the microbiology laboratory. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15:5.
183. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS microbiology letters*. 2009;299(1):1-8.
184. Machado MC, Webster TJ. Decreased *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on nanomodified endotracheal tubes: a dynamic lung model. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3825-31.
185. Marino PJ, Wise MP, Smith A, Marchesi JR, Riggio MP, Lewis MAO, et al. Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. *J Crit Care*. 2017;39:149-55.
186. Ekren PK, Ranzani OT, Ceccato A, Li Bassi G, Munoz Conejero E, Ferrer M, et al. Evaluation of the 2016 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Guideline Criteria for Risk of Multi-drug Resistant Pathogens in Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia Patients in the Intensive Care Unit. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017.
187. De Souza PR, De Andrade D, Cabral DB, Watanabe E. Endotracheal tube biofilm and ventilator-associated pneumonia with mechanical ventilation. *Microsc Res Tech*. 2014;77(4):305-12.
188. Machado MC, Webster TJ. Lipase degradation of plasticized polyvinyl chloride endotracheal tube surfaces to create nanoscale features. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2109-15.

189. Hashemi MM, Rovig J, Bateman J, Holden BS, Modelzelewski T, Gueorguieva I, et al. Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(1):143-50.
190. Wang H, Teng F, Yang X, Guo X, Tu J, Zhang C, et al. Preventing microbial biofilms on catheter tubes using ultrasonic guided waves. *Sci Rep.* 2017;7(1):616.
191. Perez-Granda MJ, Latorre MC, Alonso B, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, et al. Eradication of *P. aeruginosa* biofilm in endotracheal tubes based on lock therapy: results from an *in vitro* study. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):746.
192. Goncalves FD, de Carvalho CC. Phenotypic Modifications in *Staphylococcus aureus* Cells Exposed to High Concentrations of Vancomycin and Teicoplanin. *Front Microbiol.* 2016;7:13.
193. Pasquaroli S, Citterio B, Cesare AD, Amiri M, Manti A, Vuotto C, et al. Role of daptomycin in the induction and persistence of the viable but non-culturable state of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathogens.* 2014;3(3):759-68.
194. Pneumatikos IA, Dragoumanis CK, Bouros DE. Ventilator-associated pneumonia or endotracheal tube-associated pneumonia? An approach to the pathogenesis and preventive strategies emphasizing the importance of endotracheal tube. *Anesthesiology.* 2009;110(3):673-80.
195. Muzanye G, Morgan K, Johnson J, Mayanja-Kizza H. Impact of mouth rinsing before sputum collection on culture contamination. *Afr Health Sci.* 2009;9(3):200.

196. Weiss E, Essaied W, Adrie C, Zahar JR, Timsit JF. Treatment of severe hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: a systematic review of inclusion and judgment criteria used in randomized controlled trials. *Crit Care*. 2017;21(1):162.
197. Landelle C, Nocquet Boyer V, Abbas M, Genevois E, Abidi N, Naimo S, et al. Impact of a multifaceted prevention program on ventilator-associated pneumonia including selective oropharyngeal decontamination. *Intensive Care Med*. 2018;44(11):1777-86.
198. Tokmaji G, Vermeulen H, Muller MC, Kwakman PH, Schultz MJ, Zaat SA. Silver-coated endotracheal tubes for prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(8):Cd009201.
199. Berra L, Schmidt U, Wiener-Kronish J. Relationship Between Virulence Factors and Outcome of Ventilator-Associated Pneumonia Related to *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Respiratory Medicine Reviews*. 2010;6(1):19-25.
200. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(11):1209-23.
201. Kohler T, Guanella R, Carlet J, van Delden C. Quorum sensing-dependent virulence during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation and pneumonia in mechanically ventilated patients. *Thorax*. 2010;65(8):703-10.
202. Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *J Mol Biol*. 2015;427(23):3628-45.

203. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(6):1053-64.
204. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* 2013;21(2):73-81.
205. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* 2004;10(12):599-606.
206. Stacey SD, Pritchett CL. *Pseudomonas aeruginosa* AlgU Contributes to Posttranscriptional Activity by Increasing *rsmA* Expression in a *mucA22* Strain. *J Bacteriol.* 2016;198(13):1812-26.
207. Bazire A, Shioya K, Soum-Soutera E, Bouffartigues E, Ryder C, Guentas-Dombrowsky L, et al. The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2010;192(12):3001-10.
208. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today.* 2018.
209. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care.* 2014;2(1):10.
210. Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, et al. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8484-9.
211. Tsai CJ, Loh JM, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence.* 2016;7(3):214-29.

212. Wang K, Chen YQ, Salido MM, Kohli GS, Kong JL, Liang HJ, et al. The rapid *in vivo* evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia patients leads to attenuated virulence. *Open Biol.* 2017;7(9).
213. Kohler T, Buckling A, van Delden C. Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6339-44.



ANEXOS

TRIPTICO DEL HGUGM SOBRE MANEJO DE LA BACTERIEMIA RELACIONADA CON EL CATÉTER.



COMITÉ DE INFECCIONES, HIGIENE Y POLÍTICA
DE ANTIBIÓTICOS

RECOMENDACIONES DE PREVENCIÓN Y MANEJO DE LA BACTERIEMIA RELACIONADA CON EL CATÉTER (BRC)



Grupo de Estudio de la Infección
Asociada a Dispositivos
Intravasculares

Grupo multidisciplinar integrado por especialistas de distintos servicios
para mejorar el manejo de la BRC en la Institución (Extensiones
telefónicas)

Microbiología Clínica y EEII	(78457/ 75001/ 78453)
UCI adultos	(78615)
UCI neonatología	(846897)
UCI pediatría	(70328)
REA y UCP	(78886 / 78372)
Anestesia	(78367)
Infecciosas pediátricas	(843155)
Cirugía	(78151)
Rx Vascular	(78473)
Farmacia	(77714)
Emilio Bouza	609012196

AÑO 2017

INFORMACIÓN ANTES DE LA INSERCIÓN

Indicaciones de uso

Tipo de catéter	Indicación	Personal que implanta	Contacto
CVC no tunelizado	- Duración de uso: 1-30 días. - Administración grandes volúmenes. - Monitorización estado hemodinámico.	Cirugía UCI UCP/REA Anest UCI-neo UCI-ped	78151 78615 78372-78886 78367 846897 70328
Periférico	- Duración de uso: Terapia i.v. <6 días.	Enfermería	
PICC*	- Duración de uso: Terapia i.v. >6 días.	Radiólogos vasculares	78473
CVC tunelizado	- Duración de uso: >30 días. - Quimioterapia. - Hemodiálisis. - Plasmaféresis. - Nutrición parenteral.	Radiólogos vasculares Nutrición	78473 78542
Reservorio	- Neoplasias con varios ciclos de quimioterapia i.v.	Radiólogos vasculares	78473

* catéter central de inserción periférica.

PICCS

SE APLICARÁN LAS MISMAS
RECOMENDACIONES DE INSERCIÓN Y
MANTENIMIENTO QUE EN CVCs



RECOMENDACIONES DE INSERCIÓN

- Higiene de manos **quirúrgica** y/o **solución alcohólica**.
- Usar máximas barreras de protección (MBP): bata, guantes, mascarilla y gorro estériles.
- Usar **sábana quirúrgica** como campo estéril amplio (no paños pequeños).
- En adultos con CVC no tunelizado elegir **vía subclavia > yugular > femoral**.
- Frotar campo con **clorhexidina alcohólica 2%** (acuosa en neonatos prematuros), 30" (2' en inglés) + 30-60" de secado.
- Considerar técnica de imagen (ECO) para facilitar acceso vascular.
- Elegir **materia**l de poluretano o silicona.
- Seguir el **protocolo de inserción**, donde el enfermero/a que tutela el procedimiento puede pararlo si no se cumple alguna recomendación.
- Cubrir con **apósito** de gasa y colocar conectores cerrados.
- Si la inserción ha sido **urgente** y sin certeza de aplicación de MBP, cambiar el catéter, antes de 48 horas, por otro, idealmente recubierto de antibióticos.
- En **cat. periféricos** desinfectar la piel con clorhexidina alcohólica 2%. Usar guantes limpios, pero si no se garantiza no tocar la zona de inserción después de aplicar el antiséptico, usar guantes estériles.

RECOMENDACIONES DE MANTENIMIENTO

- Usar **soluciones alcohólicas** antes de cualquier manipulación. Y **guantes estériles**, salvo para palpación.
- Vigilar** diariamente el sitio de inserción. Visualmente si apósito transparente y por palpación si apósito de gasa.
- Cambiar apósitos de gasa cada 2 días y transparentes cada 7 (salvo humedad, suciedad...).
- Desinfectar la **piel** con clorhexidina alcohólica 2% y los **conectores** con toallitas alcohólicas antes de cada manipulación.
- No usar pomadas en el sitio de inserción (salvo hemodiálisis).
- Usar apósitos **impregnados** en clorhexidina en CVC. Cambiar cada 7d.
- Usar **conectores cerrados** (Split Septum) en todas las luces del catéter. Cambiar cada 7 d.
- Cambiar sets de administración cada 7 d (coincidiendo con conectores). Técnica aséptica. Si propofol, cambiar cada 6-12 h.
- Preguntar** diariamente al facultativo responsable la **necesidad** de continuar con el uso del catéter.
- No usar guía para recambio ante sospecha de infección. Si **recambio con guía** inevitable, el grupo multidisciplinar recomienda enviar el catéter a cultivo e insertar otro recubierto de antibióticos
- En **cat. Periféricos** el mantenimiento es igual que en CVCs, salvo que no es necesario en el cambio de apósitos guantes estériles. Preferible usar apósitos transparentes.
- Enviar punta de catéter central o periférico o reservorio completo a **cultivo** sólo ante sospecha de **infección**.

¿CÓMO DIAGNOSTICAR LA BRC?

IMPORTANTE: Enviar a **cultivo** puntas de catéteres **centrales** y **periféricos** con sospecha de infección (flebitis, etc)

Técnicas sin retirada de la vía

- Hemocultivos (HC) **diferenciales** de tiempo: a la vez de todas las luces y de vena periférica. Identificar debidamente y llamar a microbiólogo de guardia para entregar en mano.
- Cultivos **superficiales** (2 cm de piel que rodea sitio de inserción con torunda de algodón e interior de todas las conexiones con torunda de alginato).

Técnicas con retirada de la vía

- Tinción de **Gram** de la punta (alto valor predictivo negativo de colonización).
- CVCs no tunelizados y **periféricos**: Cultivo semicuantitativo de la **punta** por técnica de Maki (recuento significativo ≥ 15 ufc/placa) y/o sonicación (recuento significativo ≥ 100 ufc/cat).
- Reservorios**: Enviar siempre el reservorio completo. La punta no es suficiente.

¿CUÁNDO SE CONFIRMA LA BRC?

- Tiempo de crecimiento de HC obtenidos por luces es ≤ 2 horas que tiempo de crecimiento de HC obtenidos por vena periférica (no aplicable a levaduras) ó
- Se aísla el **mismo/s microorganismo/s** en cultivo semicuantitativo de la punta del catéter (≥ 15 ufc/placa) y en, al menos, 1 HC periférico.

MANEJO TERAPÉUTICO (I)

Indicaciones de mantenimiento de la vía

- Intentar mantener sólo catéteres sospechosos de infección que sean indispensables, siempre que no existan **complicaciones** (shock séptico, tromboflebitis supurativa, endocarditis infecciosa, bacteriemia tras 72 h tratamiento) ni **signos** locales de **infección**.
- Si se intenta conservar, realizar:

Sellado + tratamiento sistémico 7-14 días

- Sellado:** Comprobar **purgado** del catéter. Sellar con **2 mL** cada luz **idealmente 24 h** (2 h en soluciones sin heparina y 72 h en diálisis) y **rotar** la solución por todas las luces. **NO aspirar**. **Lavar** tras periodo de sellado.
- Tratamiento sistémico** → **empírico** (ver tabla 1).
→ **dirigido** (ver tabla 2).

Preparación de soluciones de sellado por catéter*

*Elegir antibiótico según etiología. Para otros antibióticos o antifúngicos → **Consultar microbiólogo**.

Vancomicina

500 mg polvo + 10 mL suero → 5 mL → 50 mL SF 0,9% ó SG 5% = 5 mg/mL → + 3 mL heparina Na 1%

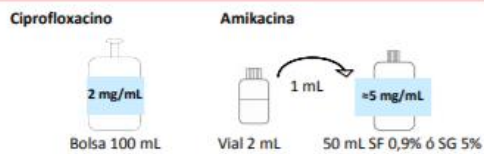
Cefazolina

1 g polvo + 4 mL API → 1 mL → 50 mL SF 0,9% ó SG 5% = 5 mg/mL → + 3 mL heparina Na 1%

La solución es de **uso inmediato**. No se debe conservar más de 24 h. La solución de sellado debe pautarse en la Prescripción Electrónica (a través de la sección **Protocolos**).

MANEJO TERAPÉUTICO (II)

Soluciones sin heparina*



*Sellar 2h, lavar, y heparinizar. Lavar siempre antes de usar de nuevo. No se añade heparina por precipitación.

Indicaciones de retirada de la vía

- Siempre que la vía **no** sea **necesaria** o si se cumple alguno de los siguientes criterios:

Paciente hemodinámicamente inestable
Tromboflebitis supurativa
Endocarditis infecciosa
Bacteriemia persistente (> 72 h de tratamiento)
Infecciones por microorganismos de difícil erradicación (<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Micobacterias</i> , Hongos, etc).

- Tratamiento sistémico → **empírico** (ver tabla 1).
- **dirigido** (ver tabla 2).

Tabla 1. Terapia antibiótica empírica (a elegir según sospecha)

Microorganismo	Elección	Indicaciones
Gram +	Vancomicina/Daptomicina	Cubrir siempre SAMR, SCN-MR.
Gram -	según epidemiología local	Cubrir multi-R en neutropénicos, gravedad o colonización por multi-R.
Levaduras	Candina/Fluconazol (según epidemiología local)	-Factores de riesgo (neutropenia, trasplante) -Vía femoral -NPT -Uso antibióticos de amplio espectro -Colonización por <i>Candida</i>

MANEJO TERAPÉUTICO (III)

Tabla 2. Terapia antibiótica dirigida (según la etiología)

Microorganismos	Elección	Alternativas
<i>S. epidermidis</i>	Vancomicina	Dapto/Linezolid
SAMS	Cloxacilina	Cefazolina
SAMR	Vancomicina	Dapto/Linezolid
<i>E. faecalis</i>	Ampicilina +/- ceftriaxona	
<i>Enterococcus ampli R</i>	Vancomicina +/- aminoglicósido	Vancomicina
<i>Enterococcus vanco R</i>	Linezolid/Daptomicina	Linezolid/Dapto
<i>P. aeruginosa</i>	Piperacilina-tazobactam	según ABgrama
Enterobacterias	según ABgrama	
<i>S. maltophilia</i>	TMP/sulfametoxazol	
<i>Candida spp. fluco S</i>	Fluconazol	
<i>Candida spp. fluco R</i>	Equinocandina	Anfotericina B


- Duración del tratamiento:

- SCN: 5-7 días.
- *Staphylococcus aureus*: 14 días.
- Bacilos Gram -: 10-14 días.
- *Candida spp.*: 14 días.

Tras primer HC negativo

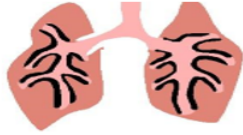


TRÍPTICO DEL HGUGM SOBRE MANEJO DE LA NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA.


Hospital General Universitario Gregorio Marañón
 SaludMadrid

Comité de Infecciones y Política de Antibióticos

RECOMENDACIONES SOBRE LA NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA (NAV) EN ADULTOS



GRUPO DE APOYO A LA NEUMONÍA GRAVE (GANG)

Grupo multidisciplinar integrado por especialistas de distintos servicios para mejorar el manejo de la Neumonía Grave en la Institución (Extensiones telefónicas)

Sº Microbiología Clínica	(78455 / 75001)
Enfermedades Infecciosas (Interconsulta)	609227884 / 609012196
Sº Medicina Intensiva	(78615)
Sº Anestesia y Reanimación	(REA: 78886 / UCP: 78372)
Sº Radiodiagnóstico	(78478)
Sº Neumología	(78328)
Sº Urgencias	(78508 / 78512)

AÑO 2018

1

PASO 0: ¿CÓMO PREVENIR LA NAVM?

Medidas generales

- **Formación** continuada del personal sanitario.
- **Higiene de manos** con soluciones alcohólicas antes y después de manipular la vía aérea.
- **Precauciones de contacto** en pacientes con microorganismos multi-resistentes.
- **Determinar al ingreso en UVI (por cultivo/PCR)**
 - estado portador de *S. aureus* (exudado nasal)
 - estado portador BLEE y carbapenemasa (exudado rectal).
- Control de la **presión del neumotaponamiento**: Mantener entre 20-30 cm H₂O por turno o continuo.
- **Higiene bucal** con clorhexidina al 0,12% cada 8 horas (previamente comprobar neumotaponamiento). Usar mascarilla.
- **Posición semisentada** 30°-45°, salvo contraindicación. Registrar por turno y después de cambios posturales. Vigilar inclinómetro.
- **Aspiración de secreciones bronquiales**: Guantes estériles, mascarilla y gafas. Sondas desechables. Técnica aséptica en la aspiración.
- **Evitar las condensaciones** en el circuito del ventilador.
- Cambiar las **tubuladuras por paciente** y cuando estén sucias.

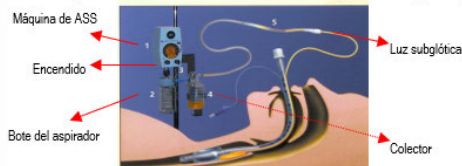
Medidas especiales

- **Antibióticos sistémicos** preventivos en pacientes intubados **SOLO** por procesos que cursan con disminución del nivel de consciencia como parada cardio-respiratoria. (ver pag. 3).
- **Aspiración de secreciones subglóticas** (ver pag.3).
- **Descontaminación selectiva digestiva** (ver pag.4).

Siempre que sea posible

- Usar ventilación no invasiva
- Intubación oro-traqueal en lugar de naso-traqueal
- Implementar protocolos de destete

2

Aspiración de secreciones subglóticas (ASS)**Inicio de la aspiración subglótica:**

1. Comprobar la presión del neumotaponamiento
2. Conectar la luz de aspiración al colector de aspiraciones
3. Encender el aspirador en modo Intermitente a 100 mmHg

**Mantenimiento de la aspiración subglótica (Por turno y en este orden)**

1. Comprobar la presión del neumotaponamiento
2. Instalación de 5-10cc de agua estéril por la luz subglótica
3. Si obstrucción; instilar 10cc de aire a presión por la luz subglótica

Desconectar la aspiración subglótica si:

Neumotaponamiento está a 0 y al extubar

Antibióticos sistémicos en pacientes con disminución del nivel de conciencia

(por ejemplo, pacientes que requieren intubación endotraqueal y ventilación mecánica por trauma grave, ACVA, PCR...de forma brusca en la comunidad)

Amoxicilina-clavulánico 1 g/8h (2 días)

ó

Ceftriaxona 2g/24 h (3 días)

3

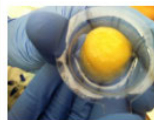
Descontaminación selectiva digestiva

Se realizará a pacientes en que se prevea VM>48h hasta la extubación y en el siguiente orden:

1. Realizar higiene bucal con clorhexidina al 0,12% c/ 6 horas



2. **Extender la pasta oral** (encías, paladar, lengua) con los dedos directamente o con una torunda / 6 horas (usar guantes).
En pacientes con traqueostomías: limpiar estoma con SF 0,9%, secar, aplicar clorhexidina acuosa y aplicar la pasta alrededor del estoma / 6 horas.



- Colistina 20 mg/g
- Nistatina 20 mg/g
- Tobramicina 30 mg/g
- Vancomicina 40 mg/g

3. **Administración de la solución digestiva:**

Combinación de antibióticos por vía digestiva / 6 horas.
Al paciente que tenga SNG se le instilarán 10ml de la solución por la SNG, lavando la sonda antes y después con 20ml de agua.



Por cada 10ml de solución acuosa aromatizada:
- Colistina 130 mg
- Nistatina 429 mg (2.6 mill UI)
- Tobramicina 156 mg

La pasta oral y la solución digestiva se solicitarán a Farmacia

4

PASO 1: ¿EL PACIENTE TIENE SOSPECHA DE NAVM? (CDC o CPIS)**CRITERIOS (CDC)**

Aparición nuevo infiltrado pulmonar en RX de tórax

+

Al menos 2 de los siguientes signos clínicos:
fiebre / hipotermia, leucocitosis/leucopenia, secreciones purulentas, deterioro gasométrico.

CRITERIOS (CPIS ≥ 6)

Temperatura (°C)	36- 38,4 38,5-38,9 ≥39 ó ≤ 36	0 1 2
Leucocitos/mm ³	4.000 -11.000 ≤ 4.000 ó ≥11.000 + desviación a la izquierda ≥ 50%	0 1 2
Secreciones traqueales	No secreciones Secreciones no purulentas Secreciones purulentas	0 1 2
Pa O ₂ /Fi O ₂	≤240 mmHg y no SDR	2
Radiografía de tórax	Infiltrado difuso Infiltrado localizado o multifocal	1 2
Infiltrados Rx	Con progresión radiológica	2
Microbiología	Sin crecimiento Cultivo con crecimiento bacteriano significativo Cultivo y Gram mismo patógeno	0 1 2

NAVM si cumple criterios del CDC o CPIS ≥ 6 y ≥ 48 horas en ventilación mecánica

PASO 2: DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

- 1- BAS u otra muestra del TRI: **Tinción de Gram y cultivo** (URGENTE en la muestra de sospecha del episodio).
- 2- Hemocultivos.
- 3- Cultivo y PCR pan-bacteriana del líquido pleural (si hay derrame subsidiario de drenaje).
- 4- Procalcitonina.
- 5- Comprobar resultados de exuda nasal y rectal del ingreso.
- 6- Considerar otras pruebas microbiológicas cuando proceda: antigenuria de *Legionella* y neumococo, búsqueda de Micobacterias, hongos, virus, etc.
- 7- Si muestra inicial con sospecha de NAVM contactar con microbiólogo para técnicas rápidas (78455 / 466103).

El tratamiento empírico debe iniciarse inmediatamente después de tomar las muestras

5

PASO 3. TRATAMIENTO EMPIRICO (1ª y 2ª dosis sin ajustar a función renal y lo más precozmente posible)

Grupo	Etiología más frecuente	Régimen empírico más habitual
Grupo I Comienzo precoz (< 5 días ingreso) y No antibióticos previos ni factor de riesgo de multi-resistencia	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>S. aureus</i> (SASM) Enterobacterias	Ceftriaxona 2g/24 h iv ó Levofloxacino 500mg/12-24 h iv ó Ertapenem 1g/24 h iv ó Augmentine 1-2gr/8h
Grupo II Comienzo tardío (> 5 días ingreso) y/o shock séptico y/o factores de riesgo de multi-resistencia: antibioterapia <90 días; hospitalización previa; residencia de cuidados crónicos; diálisis; inmunosupresión.	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> Enterobacterias (BLEE o carbapenemasa)	Piperacilina-Tazobactam 4g/6h ó Meropenem 1-2g/8h, ó Cefepima 1-2g/8-12h ó Ceftazidima 2g/8h + Ciprofloxacino 400mg/8h ó Amikacina 15-20mg/kg/24h
Grupo III Sospecha de microorganismos multi-R o XDR ↓ Añadir al grupo I	SARM <i>P. aeruginosa</i> XDR Carbapenemasa	Aztreonam 2g/8h + Ciprofloxacino 400mg/8h ± Colistina (según epidemiología) Linezolid 600mg/12h ó Vancomicina 15-20mg/kg/12h (según f.renal- monitorizar niveles a partir de 3ª día) Ceftolozano-tazobactam 2g/8h Meropenem doble dosis + Colistina ó Amikacina

6

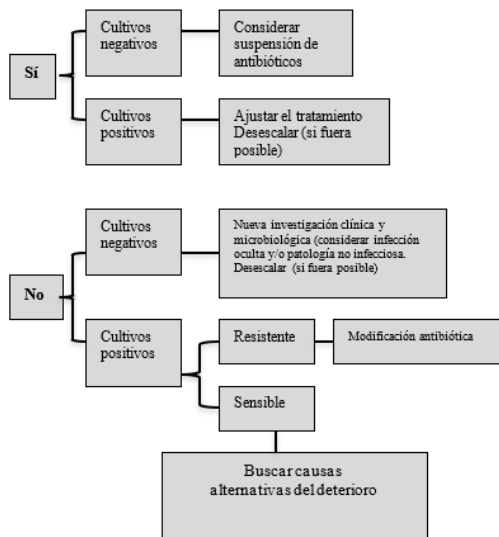
PASO 4: AJUSTAR EL TRATAMIENTO A LAS 24-48H

En base a:

- Identificación microbiológica presuntiva. Revisar resultados de técnicas moleculares (PCR).
- Sensibilidad antimicrobiana con E-test sobre muestra directa.

PASO 5: RE-EVALUAR TRATAMIENTO A LAS 72H

¿Respuesta clínica favorable?



7

TRATAMIENTO DIRIGIDO

1. Ajustar tratamiento según resultados de Microbiología y situación clínica.

2. Duración: En general, se recomienda ≤ 8 días, excepto NAVM debida a microorganismos como *P. aeruginosa* XDR, *A. baumannii* multi-R y enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasa. El nivel de procalcitonina puede ser de ayuda en la decisión del tiempo del tratamiento antibiótico.

3. Microorganismos multi-R o XDR:

- **Enterobacterias productoras de carbapenemasa:**
asociar 2 antibióticos (uno meropenem doble dosis si CMI < 8)

- **Enterobacterias productoras de BLEE:**
no asociar 2 antibióticos.

- ***P. aeruginosa* XDR:**
beta-lactámico si es sensible

- ***A. baumannii* multi-R:**
ajustar según CMI

- ***S. maltophilia:***
cotrimoxazol 1600/320mg/12h o 800/160mg/8h



Alternativas: ceftolozano-tazobactam 1-2 gr/8h (preferiblemente perfusión extendida), ceftazidima-avibactam 2/0,5g/8h, colistina dosis carga 9MU → 4,5MU/12h, tigeciclina dosis carga 200mg → 100mg/12h.

- **SAMR:**
vancomicina 15-20mg/kg/12h
linezolid 600 mg/12h
En **casos especiales:** Ceftarolina 600 mg/12h

Niveles disponibles en el hospital:

Sacar nivel único (valle)

Vancomicina:

Gentamicina:

Amikacina:

IMPORTANTE: Extraer a partir del 3º día de tratamiento.

8

FINANCIACIÓN.

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a los fondos obtenidos para los proyectos: Proyecto intramural del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón 2016 “El Biofilm en Tubos Endotraqueales: Estudio *In Vitro* de Optimización Terapéutica” (1 año, 10.000€), Proyecto FIS PI 14/01933 para el estudio: “Estudio Randomizado para Evaluar el Sellado de Catéteres Venosos Periféricos con Heparina vs. Suero Salino en Pacientes Ingresados en Medicina Interna” (3 años, 19.965€), y al contrato de Ayudante de Investigación (PEJ15/BIO/AI-0406) concedido por la Concejalía de Educación Deportes y Juventud de la Comunidad de Madrid.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS.

- Perez-Granda MJ, **Alonso B**, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Guembe M: ***In vitro* assessment of the anti-biofilm activity of ethanol alone and in combination with enoxaparin 60IU.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018, **36**(10):627-632.
- **Alonso B**, Pérez-Granda MJ, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Bouza E, Guembe M: **The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: Results from an *in vitro* study.** *J Hosp Infect* 2018.
- Perez-Granda MJ, Latorre MC, **Alonso B**, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, Guembe M: **Eradication of *P. aeruginosa* biofilm in endotracheal tubes based on lock therapy: results from an *in vitro* study.** *BMC Infect Dis* 2017, **17**(1):746.
- Perez-Granda MJ, **Alonso B**, Zavala R, Latorre MC, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, Muñoz P, Guembe M: **Selective digestive decontamination solution used as**

- “lock therapy” prevents and eradicates bacterial biofilm in an *in vitro* bench-top model.** Actualmente en revision en *Frontiers in Microbiology*.
- **Alonso B**, Pérez-Granda MJ, Latorre MC, Rodríguez C, Sánchez-Carrillo C, Muñoz P, Guembe M: **Is heparinized 40% ethanol lock solution efficient for reducing bacterial and fungal biofilms in an *in vitro* model?** Actualmente en revisión en *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
 - **Alonso B**, Fernández-Barat L, DiDomenico E, Cercenado E, Martín-Rabadán P, Merino I, de Pablos M, Muñoz P, Guembe M: **Virulence characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains causative of ventilator-associated pneumonia.** Actualmente en revision en *Virulence*.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE DOCTORADO.

- **Alonso B**, Lucio J, Perez-Granda MJ, Cruces R, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, Guembe M: **Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*?** *J Microbiol Methods* 2016.
- **Alonso B**, Cruces R, Perez A, Sanchez-Carrillo C, Guembe M: **Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm.** *J Microbiol Methods* 2017, **139**:135-137.
- **Alonso B**, Cruces R, Perez A, Fernandez-Cruz A, Guembe M: **Activity of maltodextrin and vancomycin against.** *Front Biosci (Schol Ed)* 2018, **10**:300-308.
- Diaz-Ruiz C, **Alonso B**, Cercenado E, Cruces R, Bouza E, Munoz P, Guembe M: **Can dalbavancin be used as a catheter lock solution?** *J Med Microbiol* 2018.
- Latorre MC, **Alonso B**, Cruces R, Sanz A, Sánchez-Carrillo C, Muñoz P, Guembe M: **The classification of *Staphylococcus aureus* strains by biofilm production differs depending on the method used.** Actualmente se encuentra en revision en *BMC Microbiology*.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS.

27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (Viena, Abril 2017).

- Sesión oral. **Alonso B**, Pérez-Granda MJ, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Bouza E, Guembe M. “The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: Results from an *in vitro* study”.
- Sesión oral. Pérez-Granda MJ, Latorre MC, **Alonso B**, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, Guembe M. “Eradication of *P. aeruginosa* biofilm in endotracheal tubes based on lock therapy: results from an *in vitro* study”.

XXI CONGRESO de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Málaga, Mayo 2017).

- Formato póster. **Alonso B**, Cruces R, Pérez A, Sánchez-Carrillo C, Guembe M. 2017. “Comparación entre el XTT y la resazurina en la cuantificación de la actividad metabólica del biofilm de *Staphylococcus aureus*”.
- Formato poster. Pérez-Granda MJ, **Alonso B**, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Guembe M. “Evaluación *in vitro* de la actividad anti-biofilm del etanol solo y combinado con 60 UI de enoxaparina”.

I Edición de PHDay de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Junio 2017).

- Formato póster. **Alonso B**, Pérez-Granda MJ, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Bouza E, Guembe M. “The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: Results from an *in vitro* study”. **Autor de presentación.**

XI Jornadas de jóvenes Investigadores de Albacete (Albacete, Octubre 2017).

- Sesión oral. Pérez-Granada MJ, **Alonso B**, Zavala R, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, Muñoz P, Guembe M. “Selective digestive decontamination solution used as “lock therapy” prevents biofilm formation in an *in vitro* model of ventilator-associated pneumonia”. **Autor de presentación.**

VI Jornada de Investigación e Innovación del IISGM (Madrid, Marzo 2018).

- Formato póster. **Alonso B**, Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Martín-Rabadán P, DiDomenico E, Muñoz P, Guembe M. “¿Son más virulentas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de neumonía asociada a ventilación mecánica?: producción de biofilm y letalidad en *Galleria mellonella*”. **Autor de presentación**.
- Formato póster. Pérez-Granada MJ, **Alonso B**, Zavala R, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, Muñoz P, Guembe M. “Selective digestive decontamination solution used as “lock therapy” prevents biofilm formation in an *in vitro* model of ventilator-associated pneumonia”. **Autor de presentación**.

28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (Madrid, Abril 2018).

- Sesión oral. **Alonso B**, Pérez-Granda MJ, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Bouza E, Guembe M. “The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: Results from an *in vitro* study”. **Autor de presentación**.
- Formato póster. Pérez-Granada MJ, **Alonso B**, Zavala R, Hortal J, Samaniego R, Bouza E, Muñoz P, Guembe M. “Selective digestive decontamination solution used as “lock therapy” prevents biofilm formation in an *in vitro* model of ventilator-associated pneumonia”. **Autor de presentación**.
- Formato póster. Diaz-Ruiz C, **Alonso B**, Cercenado E, Cruces R, Bouza E, Muñoz P, Guembe M. “Can dalbavancin be used as a catheter lock solution?”
- Formato póster. **Alonso B**, Cruces R, Ampuero D, Martín-Rabadán P, Sánchez-Carrillo C, Rodríguez B, Bouza E, Muñoz P, Guembe M. “Evaluation of the Alfred™ Turbidity Monitoring System (Alifax®) Following Sonication in the Diagnosis of Central Venous Catheter Colonization”.

XXII CONGRESO de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Bilbao, Mayo 2018).

- Formato póster. **Alonso B**, Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Martín-Rabadán P, DiDomenico E, Muñoz P, Guembe M. “¿Son más virulentas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de neumonía asociada a ventilación mecánica?: producción de biofilm y letalidad en *Galleria mellonella*”. **Autor de presentación.**
- Sesión oral. **Alonso B**, Fernández-Cruz A, Díaz M, Sánchez-Carrillo C, Muñoz P, Guembe M. “¿Es eficaz la terapia de sellado con vancomicina como tratamiento concomitante de la Bacteriemia Relacionada con Catéter de larga duración?”. **Autor de presentación.**
- Sesión oral. Pérez-Granada M.J., Bouza E, Pinilla B, González A, **Alonso B**, Collado J.M., Rodríguez-Íñigo M.L., Millán J, Guembe M. “Heparina versus salino en el mantenimiento de catéteres venosos periféricos: un estudio clínico, prospectivo y randomizado”.



Note

Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*?



Beatriz Alonso, MSc^{a,b}, José Lucio^c, María Jesús Pérez-Granda, RN, PhD^{b,d,f}, Raquel Cruces, LT^{a,b}, Carlos Sánchez-Carrillo, PharmD^a, Emilio Bouza, MD, PhD^{a,b,e,f}, María Guembe, PharmD, PhD^{a,b,*}

^a Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c Biology Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^d Cardiac Surgery Postoperative Care Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^e Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^f CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2016

Received in revised form 20 October 2016

Accepted 21 October 2016

Available online 21 October 2016

Keywords:

Staphylococcus aureus

Biofilm

Biomass

Metabolic activity

Crystal violet

XTT

ABSTRACT

We assessed agreement between the crystal violet binding assay and the XTT assay in the classification of biofilm production in 492 *Staphylococcus aureus* strains from bacteremic patients. We found that the overall correlation between the procedures was 46.5%. Biomass production and metabolic activity must be assessed simultaneously.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Staphylococcus aureus can cause severe infections with high morbidity and mortality rates. One of the causes of the pathogenesis of *S. aureus* infections is the ability of some strains to form a biofilm, that is, an accumulation of microorganisms embedded into an extracellular matrix, which in turn enables sessile cells to spread into the bloodstream and produce bacteremia, thus causing persistent infections and resistance to antibiotics and the immune system (Keynan and Rubinstein, 2013; Tong et al., 2015; van Hal et al., 2012).

Biofilm production by *Staphylococcus aureus* can be quantified by measuring biomass using the crystal violet (CV) binding assay or determining metabolic activity using the tetrazolium salt (XTT) assay (Coenye and Nelis, 2010; Vandecastelaere et al., 2016).

CV is a purple, basic dye that binds to negatively charged membrane molecules and polysaccharides. Unlike XTT, it binds to both live and dead cells. XTT is reduced to a soluble molecule, formazan, only by metabolically active live cells. The absorbance of formazan is proportional to the number of live cells (Peeters et al., 2008).

In contrast with data reported for *Candida* spp., the correlation between biomass production assessed by the CV assay and metabolic activity assessed by the XTT assay in *S. aureus* strains isolated from blood samples has not been established (Marcos-Zambrano et al., 2014a).

Our main objective was to establish a correlation between biomass production and metabolic activity in *S. aureus* strains isolated from bacteremic patients using a static 96-well polystyrene plate. We proposed cut-off values to classify the strains according to their ability to form biofilm (low, moderate, or high) for both procedures. We also studied the correlation between these categories.

We collected 492 *S. aureus* strains isolated from bacteremic patients admitted to our institution from 2012 to 2015. Biofilm was formed as described by Peeters et al., with some modifications. Briefly, a loopful of overnight culture of *S. aureus* was inoculated in 20 ml of TSB, which was then incubated overnight with shaking at 30 °C in an orbital shaker. After three centrifuge-resuspension cycles with PBS, the pellet was re-suspended in 10 ml of TSB. This suspension was adjusted to 0.5 McFarland turbidity using a turbidimeter, and 100 µl was inoculated in the 96-well plate and incubated at 37 °C for 24 h. Planktonic cells were removed by three washes of 100 µl of PBS. Each strain was tested in triplicate, and TSB was used as a negative control (Peeters et al., 2008).

* Corresponding author at: Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", C/. Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain.

E-mail address: mariaguembe@hotmail.com (M. Guembe).

Once the plates were completely dry, the CV assay and XTT assay were carried out as described by Marcos-Zambrano and colleagues by measuring the absorbance of CV (550 nm) and XTT (492 nm) in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400) (Coenye and Nelis, 2010; Marcos-Zambrano et al., 2014a; Vandecandelaere et al., 2016).

The values for CV and XTT ranged from 0.029 to 3.5 and 0.025 to 1.255, respectively.

The cut-offs (based on tertile ranks) used to classify the strains according to biomass production (CV)/metabolic activity (XTT) were, respectively, as follows: low, <0.530/<0.214; moderate, 0.530–1.291/0.214–0.416; and high, $\geq 1.292/\geq 0.417$.

In order to assess the correlation between the procedures, we calculated the overall categorical agreement and the individual categorical agreement for each group.

The overall categorical agreement between the procedures in the 492 *S. aureus* strains was 46.5% (229/492). The individual categorical agreement based on the tertile ranks was as follows: between low biomass producers and low metabolically active strains, 34.4% (84/244, $p < 0.001$); between moderate biomass producers and moderate metabolically active strains, 23.3% (62/266, $p = 0.012$); and between high biomass producers and high metabolically active strains, 33.9% (83/245, $p < 0.001$) (Table 1).

The correlation between CV and XTT was poor in each group.

Biofilm production in *S. aureus* plays an important role in the potential of this microorganism to cause severe infections (Keynan and Rubinstein, 2013; Tong et al., 2015; van Hal et al., 2012). Moreover, the association between *S. aureus* biofilm production and antibiotic resistance is well documented (Bhattacharya et al., 2015; McCarthy et al., 2015; Naicker et al., 2015; Pozzi et al., 2012). Therefore, production and quantification of *S. aureus* biofilm need to be assessed in depth.

This is the first study to analyze biofilm production in a large collection of *S. aureus* strains isolated from the blood of bacteremic patients. We assessed the biomass production and metabolic activity of sessile cells in an *in vitro* model based on 24-hour *S. aureus* biofilm maturation. We divided our cut-offs using tertile ranks to classify isolates as low, moderate, or high biomass producers and as having low, moderate, or high metabolic activity. The agreement between the procedures for quantification of biomass production and metabolic activity did not reach 50%, but decreased to 34.4%, 23.3%, and 33.9% when low, moderate, and high groups were compared. This suggests that both procedures are complementary, as reported for *Candida* spp. biofilms (Marcos-Zambrano et al., 2014a). Some strains showed high metabolic activity and low biomass production and *vice versa*, indicating that both parameters need to be assessed in parallel. Therefore, the ability of *S. aureus* strains to form biofilm can go undetected if only one of the procedures is performed. Moreover, biofilm production can also be related to antibiotic efficacy, as recently reported by Marcos-Zambrano et al. in 256 *C. albicans* strains in which the authors showed that micafungin was more active against highly metabolically active *Candida* biofilms (Marcos-Zambrano et al., 2014b).

Table 1
Categorical agreement between crystal violet and XTT.

		Crystal violet ^a			Total
		Low, N (%)	Moderate, N (%)	High, N (%)	
XTT ^a	Low, N (%)	84 (17.1)	46 (9.3)	34 (6.9)	164
	Moderate, N (%)	55 (11.2)	62 (12.6)	47 (9.6)	164
	High, N (%)	25 (5.1)	56 (11.4)	83 (16.9)	164
	Total	164	164	164	492

N, total no. of strains that were classified as low, moderate or high biomass producers and metabolically active by each technique.

Values in bold corresponded to the number of strains that were classified both by crystal violet and XTT as low, moderate or high.

^a The cut-offs (based on tertile ranks) used to classify the strains according to biomass production (CV)/metabolic activity (XTT) were, respectively, as follows: low, <0.530/<0.214; moderate, 0.530–1.291/0.214–0.416; and high, $\geq 1.292/\geq 0.417$.

Production of biofilm in *S. aureus* can be associated with high mortality rates. This could be explained indirectly by the relationship between biofilm production and other genetic characteristics, such as methicillin resistance or exotoxin production, which are considered to lead to persistent *S. aureus* infections (Abdelhady et al., 2014; Keynan and Rubinstein, 2013; van Hal et al., 2012). In contrast, although an association has been demonstrated between *Candida* biofilm and poor outcome in candidemic patients, no differences in clinical outcome were found between biofilm-forming isolates and non-biofilm-forming isolates in 221 clinical isolates from different sites (Barsoumian et al., 2015; Rajendran et al., 2016).

The main limitation of the study was that we used a cut-off based on the division of the strains into tertiles; therefore, future studies should be performed to assess the correlation between the procedures using different criteria to determine the cut-offs. Nevertheless, our findings for the correlation between the CV and XTT assays are based on the largest number of *S. aureus* strains to date.

In conclusion, biomass production and metabolic activity must be evaluated in parallel, as these methods are used to assess different properties of *S. aureus* biofilm.

Financial support

M. Guembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII-MICINN, CP13/00268) from the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain. Beatriz Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0406). The study has been partially financed by grants of the ISCIII (PI14/01933) and by the European Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe".

Potential conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

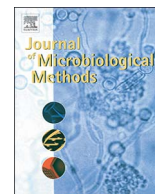
Acknowledgements

We thank Thomas O'Boyle for his help in the preparation of the manuscript.

References

- Abdelhady, W., Bayer, A.S., Seidl, K., Nast, C.C., Kiedrowski, M.R., Horswill, A.R., Yeaman, M.R., Xiong, Y.Q., 2014. Reduced vancomycin susceptibility in an *in vitro* catheter-related biofilm model correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1447–1454.
- Barsoumian, A.E., Mende, K., Sanchez Jr., C.J., Beckius, M.L., Wenke, J.C., Murray, C.K., Akers, K.S., 2015. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC Infect. Dis.* 15, 223.
- Bhattacharya, S., Bir, R., Majumdar, T., 2015. Evaluation of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and their association with biofilm production in a tertiary care hospital, Tripura, Northeast India. *J. Clin. Diagn. Res.* 9, DC01–DC04.
- Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 83, 89–105.
- Keynan, Y., Rubinstein, E., 2013. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. *Crit. Care Clin.* 29, 547–562.
- Marcos-Zambrano, L.J., Escribano, P., Bouza, E., Guinea, J., 2014a. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1192–1198.
- Marcos-Zambrano, L.J., Escribano, P., Gonzalez del Vecchio, M., Bouza, E., Guinea, J., 2014b. Micafungin is more active against *Candida albicans* biofilms with high metabolic activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2984–2987.
- McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., O'Gara, J.P., 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 5, 1.
- Naicker, P.R., Karayem, K., Hoek, K.G., Harvey, J., Wasserman, E., 2015. Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. *Microb. Pathog.* 90, 41–49.
- Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T., 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* 72, 157–165.

- Pozzi, C., Waters, E.M., Rudkin, J.K., Schaeffer, C.R., Lohan, A.J., Tong, P., Loftus, B.J., Pier, G.B., Fey, P.D., Massey, R.C., O'Gara, J.P., 2012. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog.* 8, e1002626.
- Rajendran, R., Sherry, L., Nile, C.J., Sherriff, A., Johnson, E.M., Hanson, M.F., Williams, C., Munro, C.A., Jones, B.J., Ramage, G., 2016. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012–2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 87–93.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler Jr., V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.
- van Hal, S.J., Jensen, S.O., Vaska, V.L., Espedido, B.A., Paterson, D.L., Gosbell, I.B., 2012. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 362–386.
- Vandecastelaere, I., Van Acker, H., Coenye, T., 2016. A Microplate-based system as in vitro model of biofilm growth and quantification. *Methods Mol. Biol.* 1333, 53–66.



Note

Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm



Beatriz Alonso^{a,b}, Raquel Cruces^{a,b}, Adrián Pérez^c, Carlos Sánchez-Carrillo^a, María Guembe^{a,b,*}

^a Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c Biology Department, School of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

S. aureus

Biofilm

Resazurin

XTT

Metabolic activity

ABSTRACT

We assessed whether resazurin was as efficient as XTT in the measurement of the metabolic activity of 209 clinical *Staphylococcus aureus* biofilm using an vitro model comparing the percentage of formazan and resorufin. The overall categorical agreement was 61.2% ($r = 0.024$), which means that resazurin can not substitute XTT.

Staphylococcus aureus biofilms are microbial communities that adhere to a surface and become embedded in an extracellular matrix (Tote et al., 2008). They play a key role in the development of persistent device-associated infections such as endocarditis and osteomyelitis and are therefore responsible for increasing rates of morbidity and mortality (Wagner and Hansch, 2016; Siala et al., 2016; Kong et al., 2016).

Over the past few years, biofilm has been quantified using several in vitro models (Coenye and Nelis, 2010; Pettit et al., 2005). The easiest and most common method is a static model based on 96-well plates (Stepanovic et al., 2007). The model serves to quantify both biomass and metabolic activity using compounds such as crystal violet (CV), 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide reduction (XTT), resazurin, fluorogenic Syto9, and fluorescein diacetate (FDA) (Vandecastelaere et al., 2016). However, the most widely used systems are CV and XTT, which are technologically advanced and user-friendly (Peeters et al., 2008).

CV is a basic dye that binds to negatively charged molecules present on both the surface of bacteria and the extracellular matrix of biofilm (Peeters et al., 2008). It is used for quantification of biofilm biomass, as it stains both viable and non-viable cells and is easily measured by absorbance at 550 nm (Peeters et al., 2008; Xu et al., 2016).

XTT is a tetrazolium salt that is reduced to water-soluble orange formazan by mitochondrial enzymes. Metabolic activity has been shown to be proportional to production of formazan by measuring absorbance at 492 nm (Gabrielson et al., 2002; Ginouves et al., 2014; Peeters et al., 2008; Xu et al., 2016). XTT is used for quantification of metabolic activity.

Resazurin is a less toxic and cheaper compound. Its application is less time-consuming than XTT, and it is used to quantify metabolic activity by mitochondrial action, which reduces the compound to colored, fluorescent resorufin (Peeters et al., 2008). Resazurin was recently reported to have appropriately quantified metabolic activity in microorganisms such as *Candida spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, and oral microbiota (Dalecki et al., 2016; Doll et al., 2016; Khot et al., 2008; Nam et al., 2016; Pina et al., 2016; Tawakoli et al., 2016; Vandal et al., 2015; Zarei Mahmoudabadi et al., 2014). However, data regarding its use for quantification, although becoming popular, compared with XTT of biofilm in gram-positive bacteria such as *S. aureus* are scarce. The only study comparing both assays was performed in 4 *S. aureus* strains (Pettit et al., 2009). In addition, intra-species discordance has been reported (Peeters et al., 2008; Pettit et al., 2009). Therefore, the correlation between XTT and resazurin needs to be assessed in depth in the quantification of metabolic activity in bacteria.

Our objective was to assess whether resazurin was as efficient as XTT in the measurement of the metabolic activity of the biofilm of 209 clinical *S. aureus* strains.

Metabolic activity was assessed in 209 *S. aureus* strains isolated from blood cultures obtained at Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. We used a 96-well plate-based model with a 24-hour-old biofilm, as described elsewhere (Alonso et al., 2016; Miller et al., 2010).

Briefly, a loopful of fresh culture of strains was inoculated in 20 ml of TSB and incubated overnight. After three cycle of wash-resuspension with PBS, inoculum was adjusted to 0.5 McFarland. Then, 100 μ l of the

* Corresponding author at: Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", C/. Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain.

E-mail address: maria.guembe@iisgm.es (M. Guembe).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmicmeth.2017.06.004>

Received 21 March 2017; Received in revised form 2 June 2017; Accepted 2 June 2017

Available online 03 June 2017

0167-7012/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

inoculum were placed in the microplate and incubated at 37 °C for 24 h. Plates were then, washed three times with 100 µl of PBS and dried at room temperature before developing XTT (0.5 mg/ml) (Sigma-aldrich) and resazurin (0.05 mg/ml) (Sigma-aldrich) assays.

For XTT assay, a final volume of 10 ml of a premixed solution of XTT/menadione in proportion 10 ml/1 µl was prepared before each experiment. Then, 100 µl were added to each well, incubated at 37 °C for 3 h. The absorbance was measured at 492 nm in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400).

For resazurin assay, after plates were completely dried, 100 µl of TSB plus 30 µl of resazurin were added to each plate and incubated for 2 h at 37 °C. Absorbance was measured in dual wavelength model (570-nm measurement wavelength and 590-nm reference wavelength) in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400).

Both XTT and resazurin were tested in triplicate for each strain and in parallel with tryptic soy broth as a negative control and *S. aureus* ATCC 29213 as a positive control as it has been described to be a good biofilm former (Coraca-Huber et al., 2012). Percentages of reduction of XTT and resazurin of ATCC were 68.9% and 65.3%, respectively.

Strains were classified as having low, moderate, or high metabolic activity according to the percentage reduction of XTT and resazurin to formazan and resorufin, respectively (low, < 33.3%; moderate, 33.3%–66.7%; and high, ≥ 66.7%). Absorbances were adjusted in both methods as percentage of XTT or resazurin reduction to formazan and resorufin, respectively. Percentages were calculated using Eqs. (1) and (2) from the manufacturer's instructions.

$$\%Formazan = \left(\frac{Abs_{492}strain}{Max Abs_{492}} \right) * 100 \tag{1}$$

$$\%Resorufin = \left(\frac{(\epsilon OX)_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon OX)_{\lambda_1} A_{\lambda_2}}{(\epsilon RED)_{\lambda_1} A_{\lambda_2} - (\epsilon RED)_{\lambda_2} A_{\lambda_1}} \right) * 100 \tag{2}$$

Where $(\epsilon OX)_{\lambda_2}$ = molar extinction coefficient at 590 nm of oxidized form; $(\epsilon OX)_{\lambda_1}$ = molar extinction coefficient at 570 nm of oxidized form; $(\epsilon RED)_{\lambda_2}$ = molar extinction coefficient at 590 nm of reduced form; $(\epsilon RED)_{\lambda_1}$ = molar extinction coefficient at 570 nm of reduced form; A_{λ_1} and A_{λ_2} = absorbances at 570 nm and 590 nm, respectively; and $A_{\lambda_1}^e$ and $A_{\lambda_2}^e$ = absorbances of negative control at 570 nm and 590 nm, respectively.

A 2-tailed Pearson test was used to assess the correlation between both methods. The analysis was performed with SPSS 21.0.

Absorbance for XTT and resazurin ranged from 0.011 to 0.58 and 0 to 1.038, respectively. Percentages for formazan and resorufin ranged from 1.9% to 100% and 7.1% to 100%, respectively. The analysis was based on the percentages reduction of the dyes (data not shown).

The overall categorical agreement between both techniques in the 209 *S. aureus* strains was 61.2%. The individual correlations in the low, moderate, and high groups were 57.5%, 28%, and 12.5%, respectively (Table 1). Most of the strains belonged to groups with low and moderate activity (Fig. 1). The Pearson test revealed a poor correlation between both methods ($r = 0.024$).

The poor correlation between XTT and resazurin analyzed by

Table 1
Categorical agreement between XTT and resazurin.

		XTT			Total
		Low, N (%)	Moderate, N (%)	High, N (%)	
Resazurin	Low, N (%)	96 (45.9)	21 (10.0)	2 (0.9)	119 (56.9)
	Moderate, N (%)	46 (22.0)	30 (14.4)	4 (1.9)	80 (38.3)
	High, N (%)	2 (0.9)	6 (2.9)	2 (0.9)	10 (4.8)
	Total	144 (68.9)	57 (27.0)	8 (3.8)	209

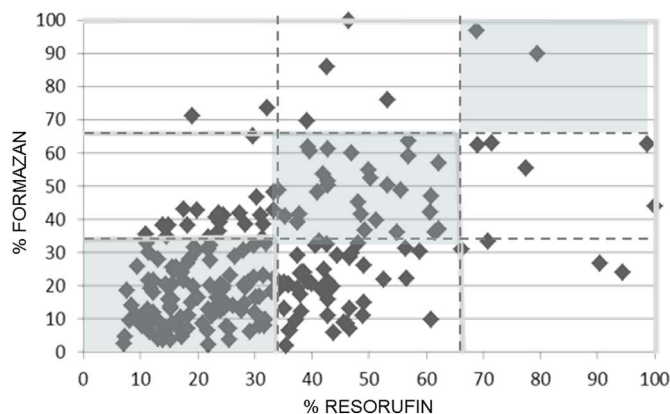


Fig. 1. Distribution of strains according to the percentage of formazan and resorufin production.

calculating the percentage of formazan and resorufin demonstrated that these techniques cannot be compared when metabolic activity of *S. aureus* biofilm is measured.

S. aureus is one of the most virulent microorganisms causing device-associated nosocomial infections. This virulence is mainly acquired by the ability of *S. aureus* to form biofilm, which can be assessed by quantification of biomass production, extracellular matrix production, and metabolic activity (Abdallah et al., 2014; Tote et al., 2008). In the present study, we compared 2 compounds that are used to quantify the metabolic activity of biofilm.

Pettit et al. obtained a high correlation after comparing these 2 assays with an *S. aureus* ATCC 29213 strain and 2 different clinical isolates ($r = 0.93$ – 0.99) (Pettit et al., 2009). However, the larger number of strains tested in our study revealed different results. We used a microtiter static plate model while they performed a shaking step during XTT or resazurin incubation. Another difference in methods compared to our study was the medium used for *S. aureus* incubation. The use of TSB instead of MHIIB may alter *S. aureus* growth and biofilm formation as it is well established that culture medium is a key factor in this process (Stepanovic et al., 2007). Due to this difference in procedure, results can differ from each study and, hence, they cannot be compared.

Ours is the first study to show that the overall correlation between the XTT and resazurin assays measured by absorbances was poor (61.2%) after testing a large collection of clinical *S. aureus* strains. Furthermore, this correlation decreased when the assays were compared according to the degree of metabolic activity—low (57.5%), moderate (28%), and high (12.5%)—suggesting that only one of these assays should be chosen when assessing the metabolic activity of *S. aureus* biofilm and that experiments based on different compounds cannot be compared. Resazurin is both fluorescence and colorimetric and, although fluorescence is more sensitive and specific than absorbance, all mechanical apparatus for measures are cheaper in colorimetric assays than in fluorescence ones (Peeters et al., 2008; Ali-Vehmas et al., 1991). These results suggest that only one of these assays should be chosen when quantifying the metabolic activity of *S. aureus* biofilm and that experiments based on different compounds cannot be compared. Based on our data, the results for metabolic activity obtained with one assay cannot be extrapolated to studies based on the other assay. Even though resazurin needs less incubation time to measure absorbance, is cheaper, and has no toxic effects on cells, XTT remains the most widely used compound for comparing results between studies and laboratories (Ali-Vehmas et al., 1991; Pantanella et al., 2013). Thus, we would recommend the use of XTT/menadione until a stabilized and standardized protocol for resazurin has been made.

Although our correlation between these two methods is poor in our study, several limitations should be considered. First, we used a static microplate model which is the most frequently and distributed biofilm

model system for its cheap cost, and the possibility to simultaneously perform a large of tests, but this system does not provide a continuous flow of nutrients into the well, depleting basic substance for biofilm formation. Hence, there is a great biological variability between not only wells but same-strain plates (Coenye and Nelis, 2010). Second, we did not assess the correlation between both procedures with colony forming units counting. Finally, strains were distributed according to metabolic activity as low, moderate, and high based on the division of the percentages of formazan and resorufin into tertiles, in which strains were not equally distributed. However, the results were the same after performing an analysis using different ranks to classify the strains. Moreover, we tried to classify the strains also in two main groups, low or high metabolically active, depending on whether moderate metabolic activity was included in one or other group. We did not find any statistically significant result either (data not shown).

In conclusion, we have found no correlation between XTT and resazurin assays in the determination of the metabolic activity of *S. aureus* biofilm. Future studies are needed to assess the correlation between both methods when the percentage reduction in the metabolic activity of *S. aureus* biofilm is determined in susceptibility testing assays in a large collection of clinical strains.

Financial support

M. Guembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII/CINN, CP13/00268) of the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain. Beatriz Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0406). The study was partially financed by grants of the ISCIII (PI14/01933) and by the European Regional Development Fund (FEDER) “A way of making Europe”.

Potential conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Thomas O'Boyle for his help in the preparation of the manuscript.

References

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.E., 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196 (7), 453–472.

Ali-Vehmas, T., Louhi, M., Sandholm, M., 1991. Automation of the resazurin reduction test using fluorometry of microtitration trays. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 38 (5), 358–372.

Alonso, B., Lucio, J., Perez-Granda, M.J., Cruces, R., Sanchez-Carrillo, C., Bouza, E., et al., 2016. Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*? *J. Microbiol. Methods*.

Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 83 (2), 89–105.

Coraca-Huber, D.C., Fille, M., Hausdorfer, J., Pfaller, K., Nogler, M., 2012. *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antibiotic susceptibility tests on polystyrene and metal surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 112 (6), 1235–1243.

Dalecki, A.G., Crawford, C.L., Wolschendorf, F., 2016. Targeting biofilm associated *Staphylococcus aureus* using resazurin based drug-susceptibility assay. *J. Vis. Exp.* 111.

Doll, K., Jongstaphongpun, K.L., Stumpp, N.S., Winkel, A., Stiesch, M., 2016. Quantifying implant-associated biofilms: comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J. Microbiol. Methods* 130, 61–68.

Gabrielsson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., Möllby, R., 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J. Microbiol. Methods* 50 (1), 63–73.

Genouves, M., Carne, B., Couppie, P., Prevot, G., 2014. Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *J. Clin. Microbiol.* 52 (6), 2131–2138.

Khot, P.D., Suci, P.A., Tyler, B.J., 2008. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: assessment using metabolic assays and colony forming units. *J. Microbiol. Methods* 72 (3), 268–274.

Kong, E.F., Tsui, C., Kucharikova, S., Andes, D., Van Dijk, P., Jabra-Rizk, M.A., 2016. Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. *MBio* 7 (5).

Miller, R.S., Norris, P.R., Jenkins, J.M., Talbot 3rd, T.R., Starmer, J.M., Hutchison, S.A., et al., 2010. Systems initiatives reduce healthcare-associated infections: a study of 22,928 device days in a single trauma unit. *J. Trauma* 68 (1), 23–31.

Nam, K.W., Jang, W.S., Jyoti, M.A., Kim, S., Lee, B.E., Song, H.Y., 2016. In vitro activity of (–)-deoxypergularinine, on its own and in combination with anti-tubercular drugs, against resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytomedicine* 23 (5), 578–582.

Pantarella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F., 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann. Ig.* 25 (1), 31–42.

Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T., 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* 72 (2), 157–165.

Pettit, R.K., Weber, C.A., Kean, M.J., Hoffmann, H., Pettit, G.R., Tan, R., et al., 2005. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (7), 2612–2617.

Pettit, R.K., Weber, C.A., Pettit, G.R., 2009. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8, 28.

Pina, R.Z., Caleffi-Ferracioli, K.R., Campanerut-Sa, P.A., Ghiraldi-Lopez, L.D., Pavan, F.R., Siqueira, V.L., et al., 2016. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis* using the fast resazurin microtiter assay plate. *Int J Tuberc Lung Dis.* 20 (11), 1535–1538.

Siala, W., Kucharikova, S., Braem, A., Vleugels, J., Tulkens, P.M., Mingot-Leclercq, M.P., et al., 2016. The antifungal caspofungin increases fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* biofilms by inhibiting N-acetylglucosamine transferase. *Nat. Commun.* 7, 13286.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., et al., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115 (8), 891–899.

Tawakoli, P.N., Attin, T., Mohn, D., 2016. Oral biofilm and caries-infiltrant interactions on enamel. *J. Dent.* 48, 40–45.

Tote, K., Vanden Berghe, D., Maes, L., Cos, P., 2008. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2), 249–254.

Vandal, J., Abou-Zaid, M.M., Ferroni, G., Leduc, L.G., 2015. Antimicrobial activity of natural products from the flora of northern Ontario, Canada. *Pharm. Biol.* 53 (6), 800–806.

Vandendelaere, I., Van Acker, H., Coenye, T., 2016. A microplate-based system as in vitro model of biofilm growth and quantification. *Methods Mol. Biol.* 1333, 53–66.

Wagner, C., Hansch, G.M., 2016. Mechanisms of bacterial colonization of implants and host response. *Adv. Exp. Med. Biol.*

Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., et al., 2016. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Curr. Microbiol.* 73 (4), 474–482.

Zarei Mahmoudabadi, A., Zarrin, M., Kiasat, N., 2014. Biofilm formation and susceptibility to amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur J. Microbiol.* 7 (7), e17105.

Accepted Manuscript

Biofilm production is not associated with poor clinical outcome in 485 patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia

María Guembe, PharmD, PhD, Beatriz Alonso, MSc, José Lucio, BSc, María Jesús Pérez-Granda, RN, PhD, Raquel Cruces, LT, Carlos Sánchez-Carrillo, PharmD, Ana Fernández-Cruz, MD, Emilio Bouza, MD, PhD

PII: S1198-743X(17)30580-3

DOI: [10.1016/j.cmi.2017.10.018](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.018)

Reference: CMI 1102

To appear in: *Clinical Microbiology and Infection*

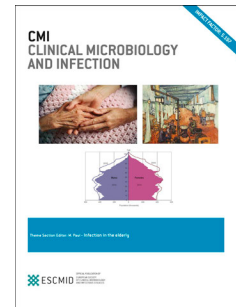
Received Date: 1 September 2017

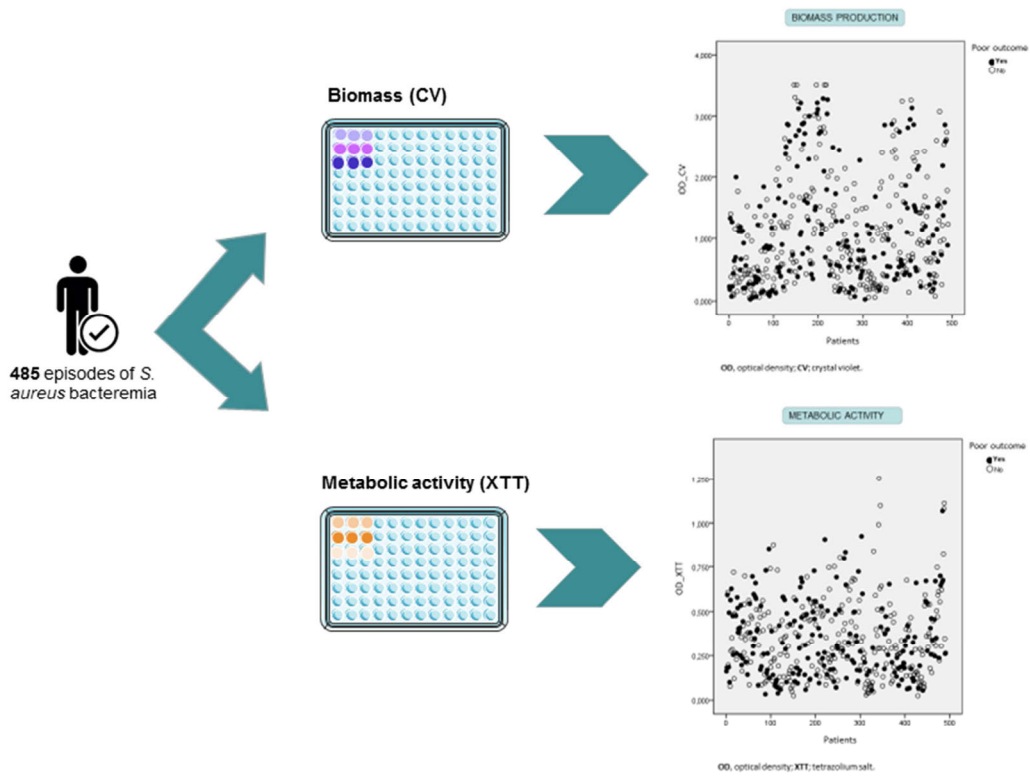
Revised Date: 2 October 2017

Accepted Date: 20 October 2017

Please cite this article as: Guembe M, Alonso B, Lucio J, Pérez-Granda MJ, Cruces R, Sánchez-Carrillo C, Fernández-Cruz A, Bouza E, Biofilm production is not associated with poor clinical outcome in 485 patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Clinical Microbiology and Infection* (2017), doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.018.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Impact of Biofilm Production In Clinical Outcome of *Staphylococcus aureus* Bacteremia

1 **Biofilm production is not associated with poor clinical outcome in 485 patients with**

2 ***Staphylococcus aureus* bacteremia**

3 María Guembe, PharmD, PhD^{1,2} #

4 Beatriz Alonso, MSc^{1,2}

5 José Lucio, BSc³

6 María Jesús Pérez-Granda, RN, PhD^{2,4,6}

7 Raquel Cruces, LT^{1,2}

8 Carlos Sánchez-Carrillo, PharmD¹

9 Ana Fernández-Cruz, MD¹

10 Emilio Bouza, MD, PhD^{1,2,5,6}

11¹ Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General

12 Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

13² Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

14³ School of Biology, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

15⁴ Cardiac Surgery Postoperative Care Unit, Hospital General Universitario Gregorio

16 Marañón, Madrid, Spain

17⁵ Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid,

18 Spain

19⁶ CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain

20 **Running title:** "*S. aureus* biofilm and clinical impact"

21 **Corresponding author:**

22 María Guembe, PharmD, PhD

23 Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas

24 Hospital General Universitario "Gregorio Marañón"

25C/. Dr. Esquerdo, 46

2628007 Madrid, Spain

27Phone: +34- 91- 586 80 27

28Fax: +34- 91- 586 86 67

29E-mail: mariaguembe@hotmail.com

ACCEPTED MANUSCRIPT

30ABSTRACT

31**Objective.** *Staphylococcus aureus* biofilm may constitute a major cause of virulence. Our
32main objective was to analyze whether there was an association between biofilm
33production and poor outcome in patients with *S. aureus* bacteremia.

34**Methods.** We studied 485 *S. aureus* strains isolated from the blood of patients with
35bacteremia from 2012 to 2015. We assessed in vitro biomass production using the crystal
36violet assay (CV) and metabolic activity using the tetrazolium salt assay (XTT). Strains were
37classified in tertile ranks as follows: low biomass producers (LBP), moderate biomass
38producers, high biomass producers (HBP), low metabolically active (LMA), moderate
39metabolically active, and high metabolically active (HMA). We excluded for the analysis
40strains with moderate CV and XTT values. We defined poor outcome as fulfillment of one
41or more of the following conditions: 30-day attributable mortality, infective endocarditis,
42persistent bacteremia, and recurrent bacteremia.

43**Results.** Outcome was poor in 199/485 (41.0%) of the *S. aureus* bacteremia episodes. The
44distribution of poor outcome with respect to biomass production and metabolic activity
45was as follows: LBP, 36.6% vs. HBP, 43.2% ($p=0.26$); and LMA, 43.5% vs. HMA, 36.2%
46($p=0.91$). The presence of methicillin-resistant *S. aureus* was the only characteristic that
47was more likely to be present in the HMA group (17.4% vs. 39.3%, $p < 0.001$).

48**Conclusions.** Biofilm production, as determined by any of the methods used in the present
49study, is not associated with poor outcome in patients with *S. aureus* bacteremia.

50**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; biofilm; biomass production; metabolic activity; clinical
51impact.

52 *Staphylococcus aureus* is a major pathogenic microorganism in severe infections with high
53 associated morbidity and mortality rates. One of the reasons for its pathogenicity is the
54 ability of some *S. aureus* strains to form a biofilm, which embeds microorganisms into an
55 extracellular matrix, thus enabling sessile cells to spread into the bloodstream, produce
56 bacteremia, and cause persistent infections and resistance to antibiotics and the immune
57 response [1-3]. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* can be quantified by
58 measuring biomass based on the crystal violet binding assay (CV) or by determining
59 metabolic activity based on the tetrazolium salt assay (XTT) [4-6]. However, to our
60 knowledge, data on the clinical impact of biofilm production in *S. aureus* strains
61 determined by either CV or XTT have not been assessed.

62 Our main objective was to analyze whether there was an association between biofilm
63 production and poor outcome in patients with *S. aureus* bacteremia.

64 We retrospectively recovered *S. aureus* strains isolated from blood of bacteremic patients
65 that were diagnosed during hospital admission between 2012 and 2015. Biofilm was
66 formed as described elsewhere [7]. The CV assay and XTT assay were carried out by
67 measuring the absorbance of CV (550 nm) and XTT (492 nm) in a spectrophotometer (EZ
68 Reader 400, Biochrom) [4, 5]. Each strain was tested in triplicate. The values for CV and XTT
69 ranged from 0.029 to 3.5 and 0.025 to 1.255, respectively. The cut-offs (based on tertile
70 ranks) used to classify the strains according to biomass production (CV)/metabolic activity
71 (XTT) were, respectively, as follows: low, <0.530/<0.214; moderate, 0.530-1.291/0.214-
72 0.416; and high, $\geq 1.292/\geq 0.417$. We recorded patient characteristics and microbiological
73 for the analysis. Values for continuous variables are expressed as the mean (SD) or median
74 (interquartile range, IQR) and as percentages, with a 95% confidence interval (95% CI),
75 when applicable, for categorical variables. Normally distributed continuous variables were

76 compared using the *t* test; non-normally distributed variables were compared using the
77 Mann-Whitney test, median test, or Kruskal-Wallis test. Categorical variables were
78 evaluated using the chi-square test or 2-tailed Fisher exact test. A 2-tailed test was used to
79 determine statistical significance, which was set at $p < 0.05$. To analyze the association
80 between biofilm production and poor outcome, we excluded *S. aureus* strains with
81 moderate CV and XTT values. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics
82 for Windows, Version 21.0 (IBM Corp, Armonk, New York, USA).

83 We included 485 patients and outcome was poor in 41.0%. Patients' characteristics are
84 detailed in **table 1**. To analyze the association between biofilm production and poor
85 outcome, only strains with low and high CV and XTT values were included (323 and 324,
86 respectively). The distribution of patients with poor outcome in the low and high biomass
87 production groups was 36.6% vs. 43.2% ($p=0.26$) (**table 1**). The only significant finding was
88 that 85.5% of the patients with a non-fatal McCabe index harbored *S. aureus* strains with
89 high biomass production ($p < 0.001$) (**table 1**). Regarding metabolic activity, we only found
90 statistically significant differences between low and high metabolically active *S. aureus*
91 strains for the median (IQR) Charlson comorbidity index (2 [1-4] vs. 3 [3-5], $p=0.02$) and
92 methicillin-resistance (17.4% vs. 39.3%, $p < 0.001$) (**table 1**). The distribution of patients
93 with poor outcome in the low and high metabolic activity groups was as follows: 43.5% vs.
94 36.2% ($p=0.91$) (**table 1**). No statistically significant differences were found between
95 biofilm production and clinical outcome by other analyses using different cut-offs to
96 classify the strains in terms of biomass production and metabolic activity (data not shown).
97 Our study revealed no association between *S. aureus* biofilm production and poor
98 outcome in bacteremic patients.

99The potential role of biofilm as the cause severe infections is still under discussion [1-3].
100Several studies have evaluated the relationship between biofilm production and clinical
101outcomes. However, data on microorganisms, types of samples, and endpoints are
102heterogeneous [8-11]. In particular, many controversies regarding the clinical impact of
103*Candida* biofilm are being described [12-15]. Recently, Barsoumian et al., found no
104differences in clinical outcome between biofilm-producing and non-biofilm-producing
105isolates from various microorganisms in 221 different clinical samples [16]. However, in
106the case of *S. aureus*, no data showing a clear association between biofilm production and
107worse clinical outcome have been reported. Ours is the first study to evaluate the clinical
108impact of biofilm in the largest collection of *S. aureus* strains isolated from blood cultures.
109In a previous study, we demonstrated that *S. aureus* biofilm must be quantified using CV
110and XTT, as both techniques are complementary [6]. Therefore, we performed our analysis
111based on biomass production and metabolic activity. However, conclusions cannot be
112extrapolated when biofilm is measured by other methods. In the present study, we could
113not find a relationship between *S. aureus* biofilm (quantified either by CV or XTT) and poor
114outcome (defined based on 30-day mortality, infective endocarditis, and/or
115persistent/recurrent bacteremia). The controversies surrounding the association between
116biofilm production and worse clinical outcome suggests that biofilm production depends
117on various factors and that interpretation is complex. Other associated features can
118interfere with evaluation. For example, a clear relationship has been reported between
119biofilm production and genetic characteristics, such as methicillin resistance or exotoxin
120production, which are considered to lead to persistent *S. aureus* infections [2, 3, 17]. These
121findings were confirmed in our study, as we detected an association between methicillin-
122resistant *S. aureus* and high metabolic activity.

123The main limitation of the study was that we used a cut-off based on the division of the
124strains into tertiles. Nevertheless, findings did not differ when different cut-offs were used
125to classify the strains into low, moderate, or high biofilm producers. We also analyzed data
126by including moderate biomass producers or moderate metabolically active strains in the
127high and low groups, and no association of biofilm production and poor outcome was
128found. Even so, our study was based on the largest number of *S. aureus* strains reported to
129date and also on an end point composed of different variables defining poor outcome.
130Bacteremic patients with low and high biofilm-forming *S. aureus* isolates had similar
131infectious outcomes in our study.

132ACKNOWLEDGEMENTS

133We thank Thomas O'Boyle for his help in the preparation of the manuscript.

134

135**Financial support.** M. Guembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII-MICINN,
136CP13/00268) of the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII),
137Madrid, Spain. Beatriz Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y
138Deporte de la Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0406). The
139study was partially financed by grants from the ISCIII (PI14/01933) and by the European
140Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe".

141

142**Potential conflicts of interest.** The authors declare no conflicts of interest.

143

144 REFERENCES

- 145 [1] Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. Staphylococcus
146 aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and
147 management. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):603-61.
- 148 [2] Keynan Y, Rubinstein E. Staphylococcus aureus bacteremia, risk factors,
149 complications, and management. *Crit Care Clin.* 2013 Jul;29(3):547-62.
- 150 [3] van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB.
151 Predictors of mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia. *Clin Microbiol Rev.* 2012
152 Apr;25(2):362-86.
- 153 [4] Vandecandelaere I, Van Acker H, Coenye T. A Microplate-Based System as In
154 Vitro Model of Biofilm Growth and Quantification. *Methods Mol Biol.* 2016;1333:53-66.
- 155 [5] Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm
156 formation. *J Microbiol Methods.* 2010 Nov;83(2):89-105.
- 157 [6] Alonso B, Lucio J, Perez-Granda MJ, Cruces R, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, et al.
158 Does biomass production correlate with metabolic activity in Staphylococcus aureus? *J*
159 *Microbiol Methods.* 2016 Oct 21.
- 160 [7] Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for
161 quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.*
162 2008 Feb;72(2):157-65.
- 163 [8] Jeong SJ, Yoon SS, Bae IK, Jeong SH, Kim JM, Lee K. Risk factors for mortality in
164 patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas*
165 *aeruginosa*: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. *Diagn*
166 *Microbiol Infect Dis.* 2014 Oct;80(2):130-5.

- 167 [9] Martinez JA, Soto S, Fabrega A, Almela M, Mensa J, Soriano A, et al.
168 Relationship of phylogenetic background, biofilm production, and time to detection of
169 growth in blood culture vials with clinical variables and prognosis associated with
170 *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr;44(4):1468-74.
- 171 [10] Ryu SY, Baek WK, Kim HA. Association of biofilm production with colonization
172 among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Intern Med*. 2016 Sep 22.
- 173 [11] Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al.
174 Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic
175 resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*.
176 2005 Sep;24(9):817-22.
- 177 [12] Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM, Hanson MF, et al. Biofilm
178 formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream
179 infection-Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Jan;22(1):87-93.
- 180 [13] Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al.
181 Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors
182 of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1843-50.
- 183 [14] Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, Posteraro P, Losito AR, De Luca A, et al.
184 Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a
185 tertiary care hospital. *PLoS One*. 2012;7(3):e33705.
- 186 [15] Pongracz J, Benedek K, Juhasz E, Ivan M, Kristof K. In vitro biofilm production of
187 *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? *J Med*
188 *Microbiol*. 2016 Apr;65(4):272-7.

189 [16] Barsoumian AE, Mende K, Sanchez CJ, Jr., Beckius ML, Wenke JC, Murray CK, et
190 al. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a
191 retrospective chart review. *BMC Infect Dis.* 2015;15:223.

192 [17] Abdelhady W, Bayer AS, Seidl K, Nast CC, Kiedrowski MR, Horswill AR, et al.
193 Reduced vancomycin susceptibility in an in vitro catheter-related biofilm model
194 correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to
195 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014
196 Mar;57(3):1447-54.

197

198

Table 1. Comparison of patients' characteristics in terms of biomass production and metabolic activity of the *S. aureus* biofilm

Variable	Total, N 485	Biomass production, N (%)		p	Metabolic activity, N (%)		p
		LBP, 161 (33.2)	HBP, 162 (33.4)		LMA, 161 (33.2)	HMA, 163 (33.6)	
Age, median (IQR), N							
Infants (0-16 years)	0.13 (0.0-2.2), 54	0.18 (0.0-5.6)	0.2 (0.0-6.8)	1.00	0.1 (0.0-1.8)	0.0 (0.0-4.5)	0.20
Adults (>16 years)	72.0 (55.9-81.0), 431	73.3 (57.0-81.5)	72.6 (55.0-81.5)	0.52	73.5 (55.9-81.5)	69.0 (54.5-81.8)	0.21
Sex, N (%)				1.00			0.93
Male	319 (65.8)	108 (67.1)	109 (67.3)		103 (64.0)	105 (64.4)	
Female	166 (34.2)	53 (32.9)	53 (32.7)		58 (36.0)	58 (35.6)	
Underlying conditions, N (%)				0.08			0.28
SOT	95 (19.6)	30 (18.6)	35 (21.6)		27 (16.8)	31 (19.0)	
Cardiac	78 (16.1)	22 (13.7)	30 (18.5)		24 (14.9)	27 (16.6)	
Abdominal	49 (10.1)	18 (11.2)	17 (10.5)		16 (9.9)	14 (8.6)	
Respiratory	30 (6.2)	17 (10.6)	7 (4.3)		6 (3.7)	12 (7.4)	
LWBN	28 (5.8)	11 (6.8)	5 (3.1)		16 (9.9)	7 (4.3)	
Renal	27 (5.6)	11 (6.8)	8 (4.9)		5 (3.1)	11 (6.7)	
Hematologic tumor	13 (2.7)	5 (3.1)	1 (0.6)		5 (3.1)	5 (3.1)	
Other	165 (34.0)	47 (29.2)	59 (36.4)		62 (38.5)	56 (34.4)	
Charlson comorbidity index, median (IQR)	3 (2-5)	3 (2-5)	3 (2-5)	0.88	2 (1-4)	3 (2-5)	0.02
McCabe score (non fatal), N (%)	368 (75.9)	111 (68.9)	139 (85.8)	<0.001	132 (82.0)	126 (77.3)	0.33
APACHE II score, median (IQR)	6 (3-6)	6 (3-7)	6 (3-6)	0.19	6 (2-6)	6 (3-6)	0.35

Poor outcome, N (%)	199 (41.0)	59 (36.6)	70 (43.2)	0.26	70 (43.5)	69 (36.2)	0.91
30-day attributable mortality	55 (11.3)	21 (13.0)	18 (11.1)	0.61	23 (14.2)	17 (10.4)	0.32
Infective endocarditis	44 (9.1)	10 (6.2)	19 (11.7)	0.12	11 (6.8)	17 (1.4)	0.32
recurrent bacteremia	30 (6.2)	7 (4.3)	13 (8.0)	0.25	12 (7.5)	11 (6.7)	0.83
persistent bacteremia	48 (9.9)	11 (6.8)	16 (9.9)	0.42	20 (12.4)	18 (11.0)	0.73
C-RBSI, N (%)	78 (16.1)	24 (14.9)	27 (16.7)	0.76	22 (13.7)	29 (17.8)	0.36
MRSA, N (%)	137 (28.2)	38 (23.6)	53 (32.7)	0.08	28 (17.4)	64 (39.3)	<0.001
Duration of antibiotic therapy (days), median (IQR)	15 (9-26)	14 (8-24)	16 (9-27)	0.07	15 (9-26)	15 (7-23)	0.44

2

3 **LBP**, low biomass production; **HBP**, high biomass production; **LMA**, low metabolic activity; **HMA**, high metabolic activity; **IQR**, interquartile

4 range; **SD**; standard deviation; **LWBN**; low-birth weight neonate; **SOT**, solid organ tumor; **C-RBSI**, catheter-related bloodstream infection;

5 **MRSA**, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

6 Statistically significant values ($p < 0.05$) are shown in bold.

ACCEPTED MANUSCRIPT

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Eradication of *P. aeruginosa* biofilm in endotracheal tubes based on lock therapy: results from an in vitro study

María Jesús Pérez-Granda^{1,2,3}, María Consuelo Latorre⁴, Beatriz Alonso^{2,5}, Javier Hortal^{1,3}, Rafael Samaniego^{2,6}, Emilio Bouza^{2,3,5,7} and María Gueembe^{2,5,8*} 

Abstract

Background: Despite the several strategies available for the management of biofilm-associated ventilator-associated pneumonia, data regarding the efficacy of applying antibiotics to the subglottic space (SS) are scarce. We created an in vitro model to assess the efficacy of antibiotic lock therapy (ALT) applied in the SS for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in endotracheal tubes (ETTs).

Methods: We applied 2 h of ALT to a *P. aeruginosa* biofilm in ETTs using a single dose (SD) and a 5-day therapy model (5D). We used sterile saline lock therapy (SLT) as the positive control. We compared colony count and the percentage of live cells between both models.

Results: The median (IQR) cfu counts/ml and percentage of live cells in the SD-ALT and SD-SLT groups were, respectively, 3.12×10^5 (9.7×10^4 -0) vs. 8.16×10^7 (7.0×10^7 -0) ($p = 0.05$) and 53.2% (50.9%-57.2%) vs. 91.5% (87.3%-93.9%) ($p < 0.001$). The median (IQR) cfu counts/ml and percentage of live cells in the 5D-ALT and 5D-SLT groups were, respectively, 0 (0-0) vs. 3.2×10^7 (2.32×10^7 -0) ($p = 0.03$) and 40.6% (36.6%-60.0%) vs. 90.3% (84.8%-93.9%) ($p < 0.001$).

Conclusion: We demonstrated a statistically significant decrease in the viability of *P. aeruginosa* biofilm after application of 5D-ALT in the SS. Future clinical studies to assess ALT in patients under mechanical ventilation are needed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Ventilator-associated pneumonia, Selective decontamination solution, Lock therapy, Confocal laser scanning microscopy

Background

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is one of the most common nosocomial infections, with significant morbidity and mortality. Between 9% and 27% of intubated patients develop VAP, although the incidence can increase to 46% in patients who require mechanical ventilation for more than 48 h after major heart surgery (MHS) [1, 2].

Bacterial biofilm is thought to be responsible for the development of respiratory infections in more than 80% of cases, with approximately 10^6 bacterial cells/cm recovered from the endotracheal tube (ETT) [3]. In

recent years, the association between VAP and biofilm has been well described, since pneumonia is associated more with the presence of biofilm than with duration of intubation [4, 5].

The various strategies for the prevention and treatment of VAP-associated biofilm include selective digestive decontamination (SDD), subglottic aspiration, antimicrobial drug-coated tubes, and devices that help to remove mucus, all of which can reduce biofilm formation in intubated patients [6–12]. Recent in vitro studies based on new designs of ETT have also described promising results regarding prevention of biofilm adhesion [13–16].

Despite the combination of compounds in the SDD solution would cover most microorganisms causing VAP and it even has not been associated to an increase of antibiotic resistance [17–20], it appears that SDD alone

* Correspondence: mariaguembe@hotmail.com

²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

⁵Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

is not enough to reduce biofilm, as it only reaches the internal surface of the ETT [21, 22]. Therefore, an additional therapy with SDD solution directly applied at the external surface of the subglottic space can be a promising approach. Antibiotic lock therapy (ALT) is used for the prevention and treatment of catheter-related bacteremia [23–26], but data on the use of an SDD solution as ALT in the prevention and treatment of VAP are scarce [27].

Therefore, our objective was to apply an in vitro bench top model to assess the efficacy of SDD solution applied in the subglottic space for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in ETTs.

Methods

Our prospective in vitro study was carried out in the laboratory of the Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

Laboratory procedure

We used a bench top in vitro model simulating adult tracheal intubation based on a cuffed ETT (TaperGuard Oral Tracheal Tube Evac Murphy Eye, Mallinckrodt™) (Fig. 1a) [7]. The ETT was colonized with 3 ml of a solution of 10^8 cfu/ml of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 in brain-heart infusion (BHI) and incubated at 37 °C for 72 h. BHI was discarded and replaced on each day of incubation. The model was run 4 times in order to test the following therapies: single dose of ALT (SD-ALT), 5 days of ALT (5D-ALT), single dose of sterile saline (SD-SLT), and 5-day SLT (5D-SLT). Sterile

saline was used as a positive control (untreated). Each experiment was tested in triplicate (Fig. 1b).

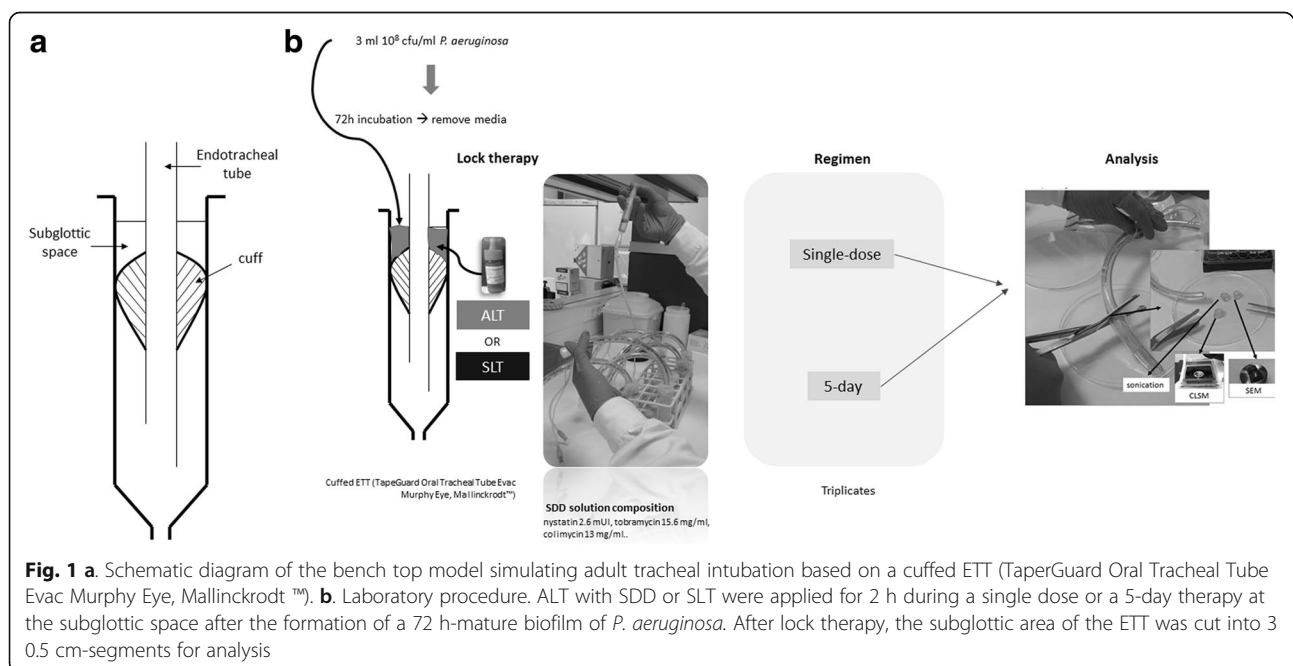
Lock therapy consisted of a 2-h application of 3 ml of either SDD solution (nystatin 2.6 mIU, tobramycin 15.6 mg/ml, and colimycin 13 mg/ml) or sterile saline in the subglottic space. In the case of 5D-ALT and 5D-SLT, we used BHI between lock therapy periods. We also assessed whether SDD solution or sterile saline leakage occurred during lock therapy.

Once lock therapy had finished, the solution was removed, and the ETTs were washed with sterile saline. The subglottic area of the ETT was then cut into 3 segments, each measuring 0.5 cm (Fig. 1b). One segment was sonicated in order to analyze the colony counts (cfu/ml) by culture and the percentage of live cells in the sonicate by image. The remaining 2 segments were processed to visualize biofilm biomass and sessile cell structure using microscopy.

Analysis of colony counts and live cells in the sonicate

Sonication was performed in 2 ml of buffer solution for 1 min at 50 Hz. For culture, the solution was serially diluted and cultured on blood agar plates, which were incubated for 24 h at 37 °C. Colony counts were expressed on a logarithmic scale as the number of cfu/ml.

For the analysis of the live/dead cells, the remaining sonicate was centrifuged (after culture), and the pellet was resuspended in 50 µl of sterile saline and stained using the Live/Dead® BacLight kit™ (BacLight kit™; Invitrogen, Barcelona, Spain) for 15 min protected from the light. Staining was performed using 0.5 µl of SYTO® 9 (stock 3.34 mM DMSO) and 0.5 µl propidium iodide



(stock 20 mM DMSO) in 20 μ l of sample mounted on coverslips and imaged using confocal laser scanning microscopy (CLSM) in an inverted confocal fluorescence microscope (SPE, Leica Microsystems) equipped with ACS APO 10 \times /0.30 and ACS APO 63 \times /1.30 objectives. Samples were imaged using an ACS APO 63 \times /1.30 objective. During imaging, SYTO 9 emits green fluorescence and is used to identify living microorganisms with an intact membrane, whereas propidium iodide emits red fluorescence and stains dead bacteria with a damaged membrane. We analyzed 3 CLSM images of each sample. FIJI software (National Institute of Health, US) was used for image quantification. The percentage of live bacteria was calculated as the ratio between the number of live cells and the total number of cells \times 100.

Visualization of biofilm biomass

For visualization of the biofilm biomass in the ETT, we inactivated the ETT segments by freezing at -80°C for 72 h. Then, after thawing for 30 min, the segments were stained with the Live/Dead[®] BacLight kit[™] for 15 min protected from the light. Staining was performed using 1.5 μ l of SYTO[®] 9 (stock 3.34 mM DMSO) and 1.5 μ l propidium iodide (stock 20 mM DMSO) in 1 ml phosphate-buffered saline. The samples were mounted on coverslips and imaged using CLSM at ACS APO 10 \times /0.30 objective [28, 29]. We displayed 6 CLSM images for each sample. Images were edited using FIJI software (National Institute of Health, US).

Visualization of sessile cell structure

Biofilm structure was imaged using a 0.5-cm half section of the ETT segment fixed in 2.5% glutaraldehyde and then in osmium tetroxide (1%) and potassium ferricyanide (0.8%). The samples were then dehydrated in graded alcohol and sputter-coated with gold atoms (Taab Laboratories Equipment Ltd., Berks, UK). Samples were imaged via a scanning electron microscope (SEM, T300, Jeol Ltd., Tokyo, Japan). We displayed 6 SEM images for each sample.

Statistical analysis

Qualitative variables appear with their frequency distribution. Quantitative variables are expressed as the median and interquartile range (IQR). Non-normally distributed continuous variables were compared using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The chi-square or Fisher exact test was used to compare categorical variables.

All statistical tests were 2-tailed. Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all the tests. The statistical analysis was performed with SPSS 21.0.

Results and discussion

Single-dose lock therapy

In the SD lock therapy model, culture of the sonicate of the ETT segments yielded a median (IQR) of 2.15×10^5 (9.7×10^4 -0.0) cfu/ml in the SD-ALT group and 8.16×10^7 (7.0×10^7 -0.0) cfu/ml in the SD-SLT group ($p = 0.05$). The median (IQR) percentage of live cells detected by CLSM was 53.2% (50.9%-57.2%) in the SD-ALT group and 91.5% (87.3%-93.9%) in the SD-SLT group ($p < 0.001$) (Fig. 2a, b).

The samples of ETT segments observed under CLSM showed a similar biomass thickness in *P. aeruginosa* biofilm for both SD-ALT and SD-SLT, as also shown by SEM. This finding correlated with the median (IQR) number of total cells: SD-ALT, 915.0 (279.0-1074.5) vs. SD-SLT, 246.0 (168.5-1130.5) ($p = 0.35$) (Fig. 2c). However, the *P. aeruginosa* cells in the SD-ALT group were deformed compared with the cells in the control group (Fig. 2d).

5-day lock therapy

Five-day lock therapy yielded a median (IQR) cfu/ml from the sonicate of the ETT segments of 0.0 (0.0-0.0) in the 5D-ALT group and 3.2×10^7 (2.32×10^7 -0.0) in the 5D-SLT group ($p = 0.03$). The median (IQR) percentage of live cells in each group was 40.6% (36.6%-60.0%) for 5D-ALT and 90.3% (84.8%-93.9%) for 5D-SLT ($p < 0.001$) (Fig. 2a, b).

We also found statistically significant differences in the median (IQR) number of total cells: SD-ALT, 32.0 (28.0-35.5) vs. SD-SLT, 50.0 (36.5-57.5) ($p = 0.01$). This finding can be observed in the CLSM images of the ETT segments, in which the thickness of the biomass was lower for 5D-ALT (Fig. 2c).

In the SEM images of Fig. 2d, the bacilli of *P. aeruginosa* were almost eradicated, and the sample was composed mainly of crystals derived from the used fluids.

Comparison between single-dose and 5-day lock therapy

In order to assess whether 5D-ALT was better than SD-ALT, we compared only the median between the percentage of live cells and the number of cfu/ml, as SD and 5D therapies were not comparable according to the total number of cells in both the ALT group and the SLT group. We found that 5D-ALT was significantly better than SD-ALT in terms of the median (IQR) cfu/ml recovered in the sonicate: 0.0 (0.0-0.0) vs. 2.15×10^5 (9.7×10^4 -0.0) ($p = 0.04$). Although there were no statistically significant differences in the median (IQR) percentage of live cells, 5D-ALT was slightly better than SD-ALT: 40.6% (36.6%-60.0%) vs. 53.2% (50.9%-57.2%) ($p = 0.12$).

When we analyzed whether leakage of lock solutions occurred through the ETT, we did not recover any other solution in either the SD or the 5D lock therapies.



Our *in vitro* data demonstrated that 5D-ALT using SDD solution applied on mature *P. aeruginosa* biofilm (72 h) in ETTs significantly reduced cell viability.

VAP is considered a major nosocomial infection, with a frequency ranging from 9% to 46% [2, 30, 31]. The highest frequencies are described among patients in MHS intensive care units (MHS-ICUs), as demonstrated in previous studies, where the risk of VAP increased among patients undergoing mechanical ventilation for more than 16.6 h after MHS [2, 32].

Biofilm formation on the ETT surface plays a key role in the pathogenesis of VAP, as it prevents the action of antibiotics and host defense cells [33]. Persistence of biofilm in the ETT of microorganisms potentially causing VAP is a common phenomenon, and, despite the use of systemic and inhaled antibiotics, patients have a worse clinical response [34].

Several preventive measures, such as subglottic aspiration and SDD, have proven effective in the reduction of VAP rates among patients under mechanical ventilation [35]. In addition, it was recently demonstrated that the use of SDD in intubated patients admitted to MHS-ICUs significantly reduced the frequency of VAP episodes [11]. However, data on the possible role of SDD solution as lock therapy in the subglottic space are scarce. A clinical study by Pneumatikos et al. demonstrated that continuous infusion of an antibiotic solution in the subglottic space significantly reduced VAP rates [27]. In our study, we used sonication and CLSM to demonstrate that a 2-h application of the SDD solution in ETT contaminated with a mature *P. aeruginosa* biofilm was associated with a considerable reduction in the number of viable cells (both cfu/ml and percentage of live cells). As for duration of

lock therapy, even though the median percentage of live cells in the sonicate of the ETT segments treated with SD-ALT was significantly lower than in the control group (53.2% vs. 91.5%, $p < 0.001$), 5D-ALT not only significantly reduced the median percentage of live cells by >50% (40.6% vs. 90.3%, $p < 0.001$), but it also reduced the median number of cfu/ml (0.0 vs. 3.2×10^7 , $p = 0.03$). Our findings were also corroborated by direct observation of the biofilm in the ETT segments using CLSM and SEM, as 5D-ALT had a thinner biomass and the bacillus was deformed. This major cell damage observed by SEM was caused by tobramycin and colimycin, since both drugs produced leakage of cellular components, with the result that the cells were deformed [36].

We believe that the difference in the total number of cells observed in both periods of lock therapy is due to marked dislodgement of dead bacteria from the biofilm on the ETT surface in the 5D model [37]. Moreover, it was important to notice the difference between the cfu/ml obtained from cultures and the percentage of live cells of the sonicate. This can be a limitation of the study due to the possible presence of viable but no-culturable cells (VBNC) or due to a lack of use of a neutralizing fluid during sample extraction, but this last procedure could have affected also the biofilm structure by dislodgement [38].

Finally, even though our in vitro model was based on a static pre-established *P. aeruginosa* biofilm, our data support using the ALT not only as a therapeutic measure once the biofilm is established, but also as a preventive measure in patients who are expected to be under mechanical ventilation for more than 48 h (from the beginning of intubation until extubation or until discharge from the ICU). Moreover, the combination of compounds in the SDD solution would cover most microorganisms causing VAP. However, despite in ICUs with low levels of antibiotic resistance there is no evidence that universal use of SDD increases antibiotic resistance, in ICUs with high endemic levels of antibiotic resistance, SDD may increase the selective pressure for antibiotic-resistant microorganisms [17–20]. Routine prophylactic use of antibiotics should be carefully introduced in hospital settings where there are high levels of antibiotic resistance [1]. Besides, the in vitro efficacy of this therapy on the biofilm of other microorganisms causing VAP (eg, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) should be tested.

Conclusion

This is the first in vitro study demonstrating by culture and microscopy that *P. aeruginosa* biofilm in ETT can be significantly eradicated after applying ALT with SDD solution in the subglottic space. Future studies are needed to further evaluate the efficacy of this approach when combined with SDD as a prophylactic measure for VAP in patients under mechanical ventilation.

Abbreviations

5D: 5-day; ALT: Antibiotic lock therapy; CLSM: Confocal laser scanning microscopy; ETT: Endotracheal tube; SD: Single dose; SDD: Selective digestive decontamination; SEM: Scanning electron microscopy; SLT: Saline lock therapy

Acknowledgements

We thank Thomas O'Boyle for his help in the preparation of the manuscript and Julio García for his help in the preparation and analysis of the images of the scanning electron microscopy.

Funding

M. Guembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII-MICINN, CP13/00268) from the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain. Beatriz Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0406). The study was partially financed by the European Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe" and by grants from the Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (II-PI-MGR-2016).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

MJP-G contributed in the conception and design of the study and had full access to all of the study data. She takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. MCL and BA made substantial contributions to acquisition, analysis, and interpretation of data. JH, and EB contributed substantially to the study design, data analysis and interpretation, and the writing of the manuscript. MG contributed to the conception and design of the study and data analysis and interpretation and was involved in drafting the manuscript and critically reviewing it for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by Comité de Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (approval number: MICRO.HGUGM.2015-075).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Cardiac Surgery Postoperative Care Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain. ⁴Biology Department, School of Biology, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ⁵Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁶Confocal Laser Scanning Microscopy Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁷Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ⁸Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", C/. Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain.

Received: 8 June 2017 Accepted: 26 November 2017

Published online: 04 December 2017

References

- American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(4):388–416.
- Hortal J, Munoz P, Cuerdo G, Litvan H, Rosseel PM, Bouza E. Ventilator-associated pneumonia in patients undergoing major heart surgery: an incidence study in Europe. *Crit Care.* 2009;13(3):R80.
- Inglis TJ, Millar MR, Jones JG, Robinson DA. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol.* 1989;27(9):2014–8.
- Danin PE, Girou E, Legrand P, Louis B, Fodil R, Christov C, et al. Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects. *Respir Care.* 2015;60(1):21–9.
- Vandecandelaere I, Coenye T. Microbial composition and antibiotic resistance of biofilms recovered from endotracheal tubes of mechanically ventilated patients. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:137–55.
- Bouza E, Perez MJ, Munoz P, Rincon C, Barrio JM, Hortal J. Continuous aspiration of subglottic secretions in the prevention of ventilator-associated pneumonia in the postoperative period of major heart surgery. *Chest.* 2008;134(5):938–46.
- Carter EL, Duguid A, Ercole A, Matta B, Burnstein RM, Veenith T. Strategies to prevent ventilation-associated pneumonia: the effect of cuff pressure monitoring techniques and tracheal tube type on aspiration of subglottic secretions: an in-vitro study. *Eur J Anaesthesiol.* 2014;31(3):166–71.
- Liu W, Zuo Z, Ma R, Zhang X. Effect of mechanical cleaning of endotracheal tubes with sterile urethral catheters to reduce biofilm formation in ventilator patients. *Pediatr Crit Care Med.* 2013;14(7):e338–43.
- Mietto C, Foley K, Salerno L, Oleksak J, Pincirolri R, Goverman J, et al. Removal of endotracheal tube obstruction with a secretion clearance device. *Respir Care.* 2013;59(9):e122–6.
- Perez Granda MJ, Barrio JM, Hortal J, Munoz P, Rincon C, Bouza E. Routine aspiration of subglottic secretions after major heart surgery: impact on the incidence of ventilator-associated pneumonia. *J Hosp Infect.* 2013;85(4):312–5.
- Pérez-Granda MJ, BJ, Hortal J, Burillo A. Impact of selective digestive decontamination without systemic antibiotics in a Major Heart Surgery ICU (MHS-ICU). LI National Congress of SEMICYUC. Oral presentation. 19–22 June, Valencia, Spain. 2016.
- Pincirolri R, Mietto C, Piriypatsom A, Chenelle CT, Thomas JG, Pirrone M, et al. Endotracheal tubes cleaned with a novel mechanism for secretion removal: a randomized controlled clinical study. *Respir Care.* 2016;
- Mann EE, Magin CM, Mettetal MR, May RM, Henry MM, De Loid H, et al. Micropatterned Endotracheal Tubes Reduce Secretion-Related Lumen Occlusion. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(12):3645–54.
- Machado MC, Webster TJ. Decreased *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm formation on nanomodified endotracheal tubes: a dynamic lung model. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3825–31.
- Jiang X, Lv B, Shen Q, Wang X. Preparation of silicon-modified antimicrobial polyethylene endotracheal tubes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;
- May RM, Hoffman MG, Sogo MJ, Parker AE, O'Toole GA, Brennan AB, et al. Micro-patterned surfaces reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro: potential for enhancing endotracheal tube designs. *Clin Transl Med.* 2014;3:8.
- Krueger WA, Lenhart FP, Neeser G, Ruckdeschel G, Schreckhase H, Eissner HJ, et al. Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections, organ dysfunctions, and mortality in critically ill surgical patients: a prospective, stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(8):1029–37.
- de Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, Bossuyt PM, Vroom MB, Dankert J, et al. Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;362(9389):1011–6.
- Daneman N, Sarwar S, Fowler RA, Cuthbertson BH. Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(4):328–41.
- Plantinga NL, Bonten MJ. Selective decontamination and antibiotic resistance in ICUs. *Crit Care.* 2015;19:259.
- Adair CG, Gorman SP, O'Neill FB, McClurg B, Goldsmith EC, Webb CH. Selective decontamination of the digestive tract (SDD) does not prevent the formation of microbial biofilms on endotracheal tubes. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31(5):689–97.
- Gorman S, Adair C, O'Neill F, Goldsmith C, Webb H. Influence of selective decontamination of the digestive tract on microbial biofilm formation on endotracheal tubes from artificially ventilated patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993;12(1):9–17.
- Bleyer AJ. Use of antimicrobial catheter lock solutions to prevent catheter-related bacteremia. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(5):1073–8.
- del Pozo JL. Role of antibiotic lock therapy for the treatment of catheter-related bloodstream infections. *Int J Artif Organs.* 2009;32(9):678–88.
- Fernandez-Hidalgo N, Almirante B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 2013;12(1):117–29.
- Liu Y, Zhang AQ, Cao L, Xia HT, Ma JJ. Taurolidine lock solutions for the prevention of catheter-related bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2013;8(11):e79417.
- Pneumatikos IA, Dragoumanis CK, Bouros DE. Ventilator-associated pneumonia or endotracheal tube-associated pneumonia? An approach to the pathogenesis and preventive strategies emphasizing the importance of endotracheal tube. *Anesthesiology.* 2009;110(3):673–80.
- Fernandez-Barat L, Ferrer M, Sierra JM, Soy D, Guerrero L, Vila J, et al. Linezolid limits burden of methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* in biofilm of tracheal tubes. *Crit Care Med.* 2012;40(8):2385–9.
- Fernandez-Barat L, Li Bassi G, Ferrer M, Bosch A, Calvo M, Vila J, et al. Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):309–17.
- Kollef MH, Chastre J, Fagon JY, Francois B, Niederman MS, Rello J, et al. Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas Aeruginosa*. *Crit Care Med.* 2014;42(10):2178–87.
- Lizan-Garcia M, Peyro R, Cortina M, Crespo MD, Tobias A. Nosocomial infection surveillance in a surgical intensive care unit in Spain, 1996–2000: a time-trend analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27(1):54–9.
- Poelaert J, Haentjens P, Blot S. Association among duration of mechanical ventilation, cuff material of endotracheal tube, and postoperative nosocomial pneumonia in cardiac surgical patients: a prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148(4):1622–7.
- Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care.* 2012;16(3):R93.
- Gordon Sahuquillo M, Geffner P, Aroca M, Villarreal Tello E, Ruiz Ramos J, Ruiz Orenga B, et al. Impact of persistent endotracheal tube biofilm on ventilator-associated pneumonia clinical and microbiological response. *Intensive Care Med Exp.* 2015;3(Suppl 1):A700.
- Berra L, De Marchi L, Panigada M, Yu ZX, Baccarelli A, Kolobow T. Evaluation of continuous aspiration of subglottic secretion in an in vivo study. *Crit Care Med.* 2004;32(10):2071–8.
- Naghmouchi K, Baah J, Hober D, Jouy E, Rubrecht C, Sane F, et al. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2719–25.
- Klare W, Das T, Ibugo A, Buckle E, Manfield M, Manos J. The glutathione-disrupted biofilm of clinical *Pseudomonas Aeruginosa* strains: enhanced antibiotic effect and a novel biofilm transcriptome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(8):4539–51.
- Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014;5:258.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

In vitro assessment of the anti-biofilm activity of ethanol alone and in combination with enoxaparin 60 IU

María Jesús Pérez-Granda^{a,b,c,d}, Beatriz Alonso^{b,e}, Ana Rodríguez-Huerta^f, Carmen Rodríguez^{b,g},
María Guebbe^{b,e,*}

^a Cardiac Surgery Postoperative Care Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES, Madrid, Spain

^d Department of Nursing, Faculty of Nursing, Physiotherapy and Pediatrics, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^e Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^f Servicio de Hematología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^g Servicio de Farmacia, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2017

Accepted 5 November 2017

Available online xxx

Keywords:

Ethanol

Lock therapy

Anti-biofilm activity

Enoxaparin

ABSTRACT

Introduction: Catheter-related bloodstream infection (C-RBSI) can sometimes be managed without catheter removal by combining systemic therapy with catheter lock therapy. Most antiseptic lock solutions are made up of ethanol combined with an anticoagulant. However, data regarding the anti-biofilm activity of ethanol combined with enoxaparin are scarce. We aimed to assess the efficacy of ethanol at different concentrations combined with enoxaparin 60 IU as a lock solution for eradication of the biofilm of different microorganisms.

Methods: Using a static 96-well plate in vitro model, we tested 30%, 35%, and 40% ethanol alone and combined with 60 IU of enoxaparin against 24-h-old biofilm from the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. Time of exposure was assessed during a 2-h and 24-h regimen. We analysed the percentage reduction in metabolic activity using the XTT assay. We considered therapy to be successful when metabolic activity was reduced by >90%.

Results: In the 2-h regimen, the therapy was successful against all microorganisms at 35% and 40% ethanol without enoxaparin ($p < 0.001$). In the 24-h regimen, the therapy was successful against all microorganisms at all ethanol solutions without enoxaparin ($p < 0.001$). When ethanol was combined with enoxaparin, the therapy was only successful in the 24-h regimen in biofilms of *S. epidermidis*, *C. albicans* and *E. coli* at all concentrations of ethanol assessed.

Conclusions: Our in vitro model demonstrated that when ethanol is combined with enoxaparin in a lock solution, it negatively affects ethanol anti-biofilm activity after both short and long exposures.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Determinación in vitro de la actividad anti-biopelícula del etanol solo y en combinación con enoxaparina 60 UI

RESUMEN

Introducción: La bacteriemia relacionada con el catéter (BRC) puede ser manejada sin la retirada del catéter mediante la combinación de terapia sistémica y terapia de sellado de catéter. Las soluciones de sellado con antisépticos más utilizadas están compuestas de etanol combinado con anticoagulante. Sin embargo, los datos sobre la actividad anti-biopelícula del etanol combinado con enoxaparina son escasos. Nuestro

Palabras clave:

Etanol

Terapia de sellado

Actividad anti-biopelícula

Enoxaparina

* Corresponding author.

E-mail address: mariaguembe@hotmail.com (M. Guebbe).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.11.007>

0213-005X/© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

objetivo fue evaluar la eficacia del etanol a diferentes concentraciones combinado con enoxaparina 60 UI como solución de sellado para la erradicación de la biopelícula de diferentes microorganismos.

Métodos: Mediante un modelo in vitro estático en placa de 96 pocillos, testamos etanol al 30, 35 y 40% solo y combinado con 60 UI de enoxaparina frente a una biopelícula de 24 h de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El tiempo de exposición se evaluó durante un régimen de 2 y 24 h. Se analizó el porcentaje de reducción de la actividad metabólica mediante el ensayo XTT. Consideramos éxito de la terapia cuando la actividad metabólica se redujo >90%.

Resultados: En el régimen de 2 h, la terapia fue exitosa contra todos los microorganismos a concentraciones de etanol del 35 y 40% sin enoxaparina ($p < 0,001$). En el régimen de 24 h, la terapia fue exitosa contra todos los microorganismos en todas las soluciones de etanol sin enoxaparina ($p < 0,001$). Cuando se combinó etanol con enoxaparina, la terapia solo tuvo éxito en el régimen de 24 h en todas las concentraciones de etanol evaluadas frente a biopelículas de *S. epidermidis*, *C. albicans* y *E. coli*.

Conclusiones: Nuestro modelo in vitro demostró que la adición de enoxaparina a etanol en solución de sellado afecta negativamente a la actividad anti-biopelícula del etanol tanto tras exposiciones cortas como largas.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
Todos los derechos reservados.

Introduction

Catheter-related bloodstream infection (C-RBSI) is one of the most common nosocomial infections. Approximately 1–2 episodes per 1,000 catheter days have been recorded in intensive care units (ICU), and the mortality rate has been reported to rise to 25%.^{1–3}

The distribution of causative microorganisms is as follows: Gram-positive cocci, 70% (coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, enterococci); Gram-negative bacilli, 20% (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*); and yeasts, 10% (*Candida* spp.).^{2,4,5} The ability of bacteria and yeasts to cause C-RBSI depends on their capacity to form biofilms on the catheter surface, and their adherence to medical devices promotes persistent infection and treatment failure.^{6,7}

Guidelines recommend removing the catheter when C-RBSI is suspected. However, when the infection has to be managed with the catheter in place, combining systemic antimicrobial treatment with antibiotic lock therapy (ALT) is also recommended.^{4,8–12} ALT is based on the instillation of approximately 2 ml of a high concentration of antimicrobials (MIC $\times 100$ – $\times 1,000$) for 2–24 h.¹⁰ However, the properties of biofilm and the increasing frequency of multidrug-resistant strains are leading ALTs to fail.¹³ Alternatively, antiseptic lock solutions have been proposed as a novel alternative to ALTs, as no resistance to antiseptic has been reported.^{14,15}

Ethanol is one of the most commonly used antiseptics in the clinical setting. It is administered in combination with an anticoagulant to prevent catheter occlusion and cracking after more than 2 h of antiseptic lock therapy.¹⁶ In a recent in vitro study, ethanol was shown not to affect the activity of enoxaparin.¹⁷ However, to the best of our knowledge, the efficacy of combining ethanol with enoxaparin as a catheter lock solution has not been assessed against microbial biofilms in a 96-well microplate.

Our objective was to test the efficacy of ethanol at 30%, 35%, and 40% alone and in combination with enoxaparin 60 IU as a lock solution for eradication of pre-formed biofilms of various microorganisms.

Materials and methods

We ran a static in vitro model in a 96-well polystyrene plate in which ethanol-based lock solutions were tested against 24-h-old biofilms of the following strains: *S. aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* (clinical strain), *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *E. coli* ATCC25922, and *Candida albicans* ATCC14058.

Laboratory procedure

A loopful of 24-h-old culture of the following strains was inoculated into 20 ml of their corresponding liquid media: staphylococci in Tryptic Soy Broth (TSB), *E. faecalis* in TSB enriched with 1% glucose, *C. albicans* in Roswell Park Memorial Institute (RPMI), and *E. coli* in Luria-Bertani Broth (LB).^{18–20} Microbial suspensions were cultured overnight at 30 °C under orbital shaking. Biofilms were formed as described elsewhere.²¹ Briefly, inoculums were washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS) and adjusted to an optical density of 0.5 McFarland, or 0.35 McFarland in the case of *C. albicans*. From this suspension, 100 μ l was added to each well, and plates were cultured at 37 °C for 24 h. Each strain was tested 12 times using a positive control treated with medium and a negative control treated without microorganisms. After incubation, plates were washed 3 times with PBS and 120- μ l ethanol-based solutions mixed with 120 μ l of medium were added to each well except in positive control wells, where only 120 μ l of medium was added. Plates were incubated again for 2 and 24 h at 37 °C, before being washed 3 times with PBS and dried completely. Then, 100 μ l of XTT-menadione (10 ml 1 mg/ml–40 μ l 1.72 mg/ml), which was prepared immediately before the experiment, was added to each well, and the plates were incubated in darkness at 37 °C for 2 h. Absorbance was measured at 492 nm in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400).

Preparation of ethanol-based solutions

Solutions were prepared immediately before each experiment as follows: 30%, 35%, and 40% ethanol alone and with 60 IU of enoxaparin (Clexane[®] 40 mg, 4000 IU, enoxaparina sódica, Sanofi-Aventis, S.A.A, Barcelona, Spain) (as is the standard used in our institution for catheter lock). All ethanol concentrations are expressed as % (v/v) in distilled water.

Data analysis

We assessed the percentage reduction in metabolic activity by comparing absorbance at 490 nm in the positive control wells and in the treated wells. We considered therapy to be successful when metabolic activity was reduced by >90%.

The qualitative variables appear with their frequency distribution. The quantitative variables are summarized as the median (IQR). Continuous variables were compared using the *t* test; non-normally distributed variables were compared using the

Kruskal–Wallis test. The differences between groups were compared using the Mann–Whitney test with a Bonferroni correction. All statistical tests were 2-tailed. Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all the tests. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

The overall median reduction in metabolic activity is shown in Fig. 1. The median reduction obtained for each strain tested with all the solutions at different times of exposure is shown in Table 1.

Two-hour regimen

In the 2-h regimen, therapy was successful in all the microorganisms tested when the solution of $\geq 35\%$ ethanol alone was used. For 30% ethanol, this reduction was only achieved for *S. epidermidis*

and *E. coli* (Fig. 2B and D). No significant differences in reduction were found between ethanol 35% and 40% ($p > 0.05$).

Concentrations of 30% ethanol–enoxaparin reduced the overall median metabolic activity by up to 36%. At 35% ethanol–enoxaparin, the median reduction in metabolic activity ranged from 49% to 89.2%. The same range was observed when 40% ethanol–enoxaparin solutions were used (Fig. 1). However, no reduction was found for *C. albicans* with any of the 3 concentrations of ethanol–enoxaparin tested (Fig. 2E).

Twenty-four-hour regimen

In the 24-h regimen, therapy was successful in all the microorganisms tested at all the ethanol concentrations (Fig. 1). However, when ethanol was combined with enoxaparin, a significant reduction in metabolic activity was observed only for *S. epidermidis*, *E. coli*, and *C. albicans* at all the ethanol concentrations ($p < 0.001$) (Fig. 2B, D, and E). In contrast, with *S. aureus* and *E. faecalis*, the

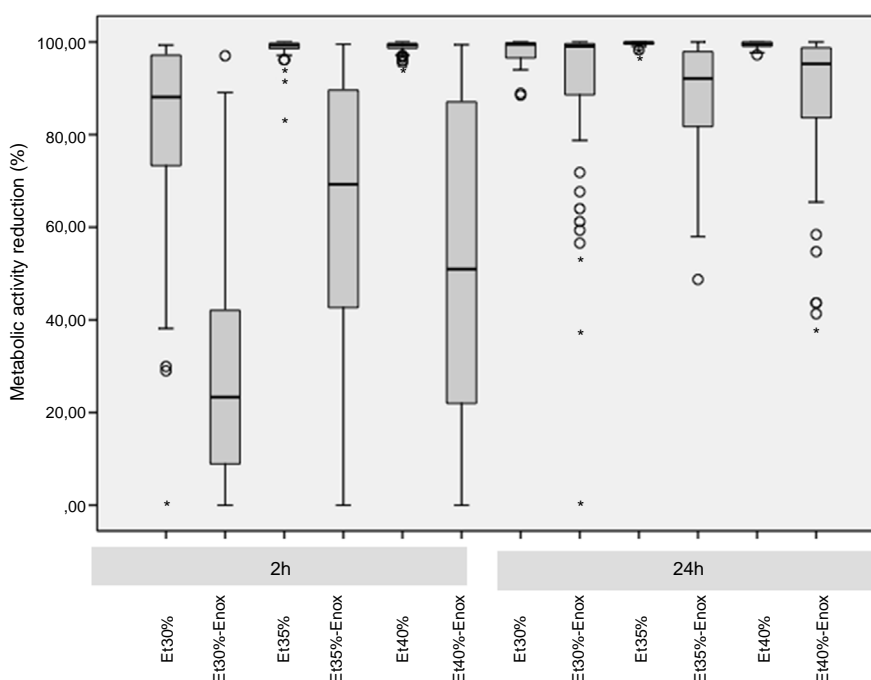


Fig. 1. Overall median reduction in metabolic activity after treatment with an ethanol-based lock solution. Asterisks correspond to extreme outliers.

Table 1

Reduction in metabolic activity of the biofilm-forming strains after treatment with an ethanol-based lock solution.

Lock solution composition	Duration of exposure	Median (IQR) percentage reduction in metabolic activity				
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
30% ET	2 h	34.1 (0–43.9)	93.7 (90.7–96.8)	92.1 (82.9–94.7)	98.9 (98.6–99.3)	79.8 (75.2–86.1)
	24 h	95.5 (94.4–96.1)	100 (99.5–100)	97.9 (95.6–98.5)	100 (99.6–100)	99.8 (99.6–99.7)
30%ET-ENOX	2 h	6.9 (0–26.3)	33.2 (27.8–47.0)	69.8 (14.4–83.4)	21.8 (13.1–40.2)	9.4 (7.6–11.6)
	24 h	99.6 (99.4–99.9)	96.6 (94.4–99.4)	62.6 (53.8–77.0)	99.7 (95.8–99.9)	99.3 (98.3–99.6)
35%ET	2 h	98.9 (95.1–99.8)	98.1 (96.6–100)	99.8 (99.3–100)	98.8 (98.7–99.2)	99.4 (99.3–99.5)
	24 h	99.6 (99.4–99.9)	100 (100–100)	99.5 (99.1–100)	100 (100–100)	99.7 (99.6–99.8)
35%ET-ENOX	2 h	89.6 (87.7–93.5)	60.5 (40.2–70.6)	66.8 (52.1–71.6)	98.5 (83.2–99.2)	18.3 (0–31.7)
	24 h	87.8 (78.7–91.5)	92.2 (87.9–97.7)	75.3 (73.0–87.9)	100 (99.4–100)	94.0 (90.0–97.5)
40%ET	2 h	99.0 (97.5–99.3)	100 (98.1–100)	99.6 (99.1–100)	98.8 (97.3–99.4)	99.5 (99.3–99.7)
	24 h	99.2 (98.5–99.5)	100 (99.6–100)	98.4 (97.8–99.1)	100 (99.8–100)	99.6 (99.4–99.7)
40%ET-ENOX	2 h	90.2 (84.1–93.4)	44.7 (28.7–61.7)	30.2 (24.7–70.4)	89.6 (62.9–95.7)	0 (0.0–0.0)
	24 h	83.6 (80.6–93.3)	96.4 (92.6–96.9)	62.1 (43.6–86.7)	100 (98.4–100)	98.1 (96.9–98.9)

ET, ethanol; ENOX, enoxaparin; IQR, interquartile range.

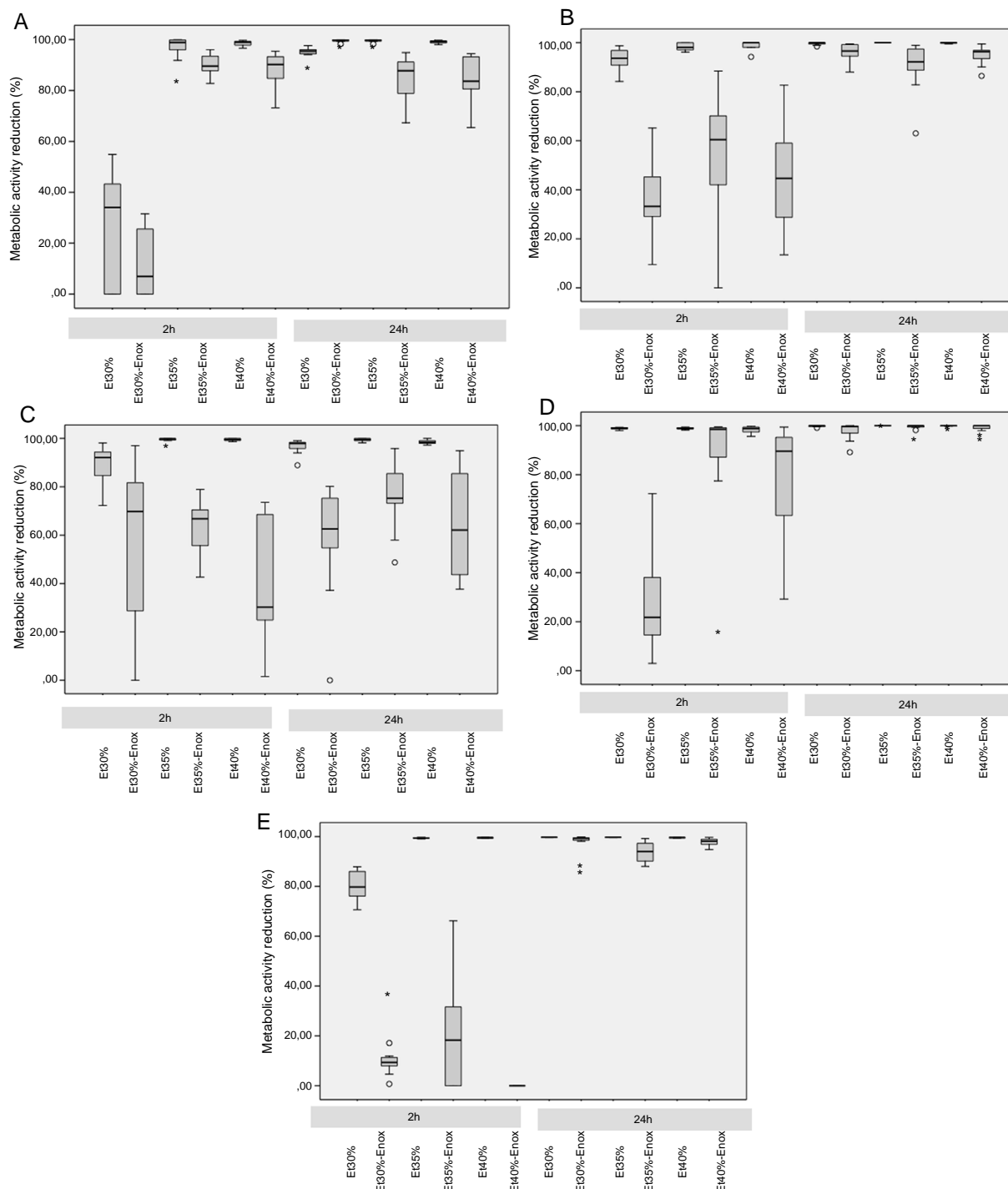


Fig. 2. Median reduction in metabolic activity of the various biofilm-forming strains after treatment with an ethanol-based lock solution. (A) *Staphylococcus aureus* ATCC25923. (B) *Staphylococcus epidermidis* (clinical strain). (C) *Enterococcus faecalis* ATCC33186. (D) *Escherichia coli* ATCC25922. (E) *Candida albicans* ATCC14058. Asterisks correspond to extreme outliers.

median reduction in metabolic activity did not reach 90% when they were treated with solutions of ethanol at any concentration combined with enoxaparin (Fig. 2A and C).

Discussion

Our data showed that enoxaparin used as an adjuvant anti-coagulant in ethanol-based lock solutions negatively affects the anti-biofilm activity of ethanol. Higher concentrations of ethanol were required to obtain better percentage reductions in metabolic activity after combination with enoxaparin.

The consequences of C-RBSI after insertion of a central venous catheter (CVC) in ICU patients can be fatal.²² Guidelines recommend removing the catheter when there is suspicion of C-RBSI. However, in situations where catheter withdrawal is not possible, the combination of systemic therapy and ALT can be useful.^{8,10,23} Several studies have shown antiseptic lock solutions such as ethanol to be a sufficiently efficacious alternative to ALTs.^{9,11,16} However, the heterogeneity of the study designs prevents consensus on the appropriate concentration and regimen to be used.²⁴ Most studies showed the best activity with 70% ethanol. However, it has also been demonstrated that 70% ethanol was not only unsafe

for patients, but also disrupted the catheter surface.^{25,26} In our study, we showed that 35% or 40% ethanol alone was sufficiently high for a >90% reduction in the metabolic activity of the biofilm of all the tested microorganisms in a 2-h lock solution regimen ($p < 0.001$).

When ALT is administered for >2 h, the solution must contain anticoagulants in order to prevent catheter occlusion. The most popular anticoagulant in lock solutions is heparin, both in its unfractionated form (UFH) and low-molecular-weight form (LMWH).²⁷ Enoxaparin is the most representative LMWH and is replacing UFH owing to its more predictable pharmacokinetic profile and ease of use, although data on its effect and stability in ethanol lock solutions are scarce.²⁸ Calvet et al. demonstrated that enoxaparin was stable in 40% ethanol and that it had only a marginal impact on the catheter surface. Moreover, in a study by Balestrino et al., the efficacy of enoxaparin 400 IU/ml and 40% ethanol made it possible to eradicate the biofilm of *S. aureus* and *C. albicans*. In addition, the authors confirmed that the integrity of the catheter was not affected.^{16,17} Biofilms were formed and treated in microfermentors containing segments of silicon catheters, and a significant reduction in the viability of cells (in colony-forming units) was achieved for all their strains when a 24-h regimen was followed, even in *S. aureus*. In contrast to these results, we found that 60 IU of enoxaparin altered the anti-biofilm activity of ethanol in *S. aureus* and *E. faecalis* for the 24-h therapy. However, the combination worked properly with *S. epidermidis*, *C. albicans*, and *E. coli* biofilms. Moreover, the shortest regimen used by Balestrino et al. was 4 h, compared with 2 h in our study, thus showing that the effect of ethanol–enoxaparin solutions was not only ethanol concentration–dependent but also time–dependent. However, although the methodology used was different, both XTT and colony-forming unit counts could help to assess the in vitro anti-biofilm activity of ethanol.

Based on our data, we consider that a 2-h regimen of either 35% or 40% ethanol alone could be used until the microorganism has been identified. However, if a 24-h regimen of ethanol is used, anticoagulants other than enoxaparin should be administered, at least in the case of *S. aureus* and *E. faecalis* infections.

Although ours is one of the first studies to assess the anti-biofilm activity of ethanol combined with enoxaparin as a lock solution, it has some limitations. First, our methodology using a static in vitro model was only based on calculating the percentage reduction in metabolic activity as an indirect measure for biofilm reduction. Besides, we also used a clinical strain of *S. epidermidis* instead of an ATCC which could have different behaviour. Therefore, future studies including more clinical strains must be performed to assess the correlation between metabolic activity and cell viability or re-growth assays.

Conclusion

Based on our in vitro results, enoxaparin could negatively affect the anti-biofilm properties of ethanol. We consider that a 35% ethanol-based lock solution is appropriate to be used as a lock therapy. For therapies of >2 h, anticoagulants other than enoxaparin may be used at least in the case of *S. aureus* and *E. faecalis* infections.

Financial support

M. Guembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII-MICINN, CP13/00268) from the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain. Beatriz Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/

AI-0406). The study was partially funded by the European Regional Development Fund (FEDER) “A way of making Europe”.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Thomas O’Boyle for his help in the preparation of the manuscript.

References

1. Rupp ME, Majorant D. Prevention of vascular catheter-related bloodstream infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30:853–68.
2. Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2014;4:162–7.
3. Yousef A, Jamal MA, Raad I. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:157–79.
4. O’Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis.* 2011;52:e162–93.
5. Shah H, Bosch W, Thompson KM, Hellinger WC. Intravascular catheter-related bloodstream infection. *Neurohospitalist.* 2013;3:144–51.
6. Ramasamy M, Lee J. Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1851242.
7. Woo SG, Lee SY, Lee SM, Lim KH, Ha EJ, Eom YB. Activity of novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Folia Microbiol (Praha).* 2017;62:157–67.
8. Raad I, Chaftari AM, Zakhour R, Jordan M, Al Hamal Z, Jiang Y, et al. Successful salvage of central venous catheters in the setting of catheter related or central line associated bloodstream infections using catheter lock consisting of minocycline, EDTA and 25% ethanol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:3426–32.
9. Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O’Gara JP, O’Neill E. In vitro approach for identification of the most effective agents for antimicrobial lock therapy in the treatment of intravascular catheter-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:2923–31.
10. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1–45.
11. Chaudhury A, Rangineni JB. Catheter lock technique: in vitro efficacy of ethanol for eradication of methicillin-resistant staphylococcal biofilm compared with other agents. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65:305–8.
12. Suzuki M, Satoh N, Nakamura M, Horita S, Seki G, Moriya K. Bacteremia in hemodialysis patients. *World J Nephrol.* 2016;5:489–96.
13. Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo JM, Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:1704–12.
14. Cullis DJ, Keene DJ, Zaman A, Barker C, Govan L, Minford J. Chemical stability of heparin, isopropanol, and ethanol line lock solutions. *J Pediatr Surg.* 2015;50:315–9.
15. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:147–79.
16. Balestrino D, Quintana M, Charbonnel N, Forestier C, Lartigue C, Souweine B. Compatibility of injectable anticoagulant agents in ethanol; in vitro antibiofilm activity and impact on polyurethane catheters of enoxaparin 400 U/mL in 40% v/v ethanol. *PLOS ONE.* 2016;11:e0159475.
17. Calvet L, Piot M, Lartigue C, Souweine B, Tardy-Poncet B. Anticoagulant properties of enoxaparin 400 IU/mL–40% ethanol catheter lock solution. *Springerplus.* 2015;4:746.
18. Arzmi MH, Alnuaimi AD, Dashper S, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M. Polymicrobial biofilm formation by *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain and medium dependent. *Med Mycol.* 2016;54:856–64.
19. Han R, Klu YAK, Chen J. Attachment and biofilm formation by selected strains of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of fresh produce origin. *J Food Sci.* 2017;82:1461–6.
20. Serrano-Fujarte I, Lopez-Romero E, Reyna-Lopez GE, Martinez-Gamez MA, Vega-Gonzalez A, Cuellar-Cruz M. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. *Biomed Res Int.* 2015;2015:783639.
21. Alonso B, Lucio J, Perez-Granda MJ, Cruces R, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, et al. Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*? *J Microbiol Methods.* 2016;131:110–2.
22. Atilla A, Doganay Z, Celik HK, Tomak L, Gunal O, Kilic SS. Central line-associated bloodstream infections in the intensive care unit: importance of the care bundle. *Korean J Anesthesiol.* 2016;69:599–603.
23. Pittiruti M, Bertoglio S, Scoppetulo G, Biffi R, Lamperti M, Dal Molin A, et al. Evidence-based criteria for the choice and the clinical use of the most

- appropriate lock solutions for central venous catheters (excluding dialysis catheters): a GAVeCeLT consensus. *J Vasc Access.* 2016;17:453–64.
24. Mermel LA, Alang N. Adverse effects associated with ethanol catheter lock solutions: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:2611–9.
 25. Mokha JS, Davidovics ZH, Samela K, Emerick K. Effects of ethanol lock therapy on central line infections and mechanical problems in children with intestinal failure. *J Parenter Enteral Nutr.* 2017;41.
 26. Pérez-Granda MJ, Barrio JM, Muñoz P, Hortal J, Rincon C, Rabadan PM, et al. Ethanol lock therapy (E-Lock) in the prevention of catheter-related bloodstream infections (CR-BSI) after major heart surgery (MHS): a randomized clinical trial. *PLOS ONE.* 2014;9:e91838.
 27. Goossens GA. Flushing and locking of venous catheters: available evidence and evidence deficit. *Nurs Res Pract.* 2015;2015:985686.
 28. Merli GJ, Groce JB. Pharmacological and clinical differences between low-molecular-weight heparins: implications for prescribing practice and therapeutic interchange. *P T.* 2010;35:95–105.

Activity of maltodextrin and vancomycin against *staphylococcus aureus* biofilm

Beatriz Alonso^{1,2}, Raquel Cruces^{1,2}, Adrian Perez³, Ana Fernandez-Cruz², Maria Gueembe^{1,2}

¹Instituto de Investigacion Sanitaria Gregorio Maranon, Madrid, Spain, ²Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Maranon, Madrid, Spain, ³Biology Department, School of Biology, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Background
3. Methods
 - 3.1. Biofilm formation
 - 3.2. Vancomycin and maltodextrin solutions and treatment procedure
 - 3.3. Quantification of metabolic activity by XTT assay
 - 3.4. Quantification of metabolic activity by resazurin assay
 - 3.5. Quantification of cfu per well
 - 3.6. Statistical analysis
4. Results
5. Discussion
6. Acknowledgements
7. References

1. ABSTRACT

We aimed to assess the anti-biofilm activity of vancomycin, maltodextrin, and their combination against vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) and vancomycin-susceptible *S. aureus* (VSSA) strains based on an *in vitro* static model. Biofilms of 4 VSSA and 2 VRSA strains were grown in a 96-well static model. Vancomycin 2 mM, maltodextrin 10 mM, and both in combination were tested using tetrazolium salt (XTT), resazurin, and cfu/well counts. The efficacy of the antimicrobial solutions was expressed as the percentage reduction in metabolic activity with each method. Overall percentage reduction in the metabolic activity of VSSA was 79.3%, 34%, and 75.7% for vancomycin, maltodextrin, and their combination ($p < 0.001$). Overall percentage reduction in metabolic activity of VRSA was 46.7%, 27.8%, and 34.6% for vancomycin, maltodextrin, and their combination ($p > 0.05$). Maltodextrin did not improve the anti-biofilm efficacy of vancomycin in VSSA or in VRSA biofilms. XTT cannot replace cfu counts as a means of quantifying cell viability. Future studies are needed to assess the synergistic effects of other non-antimicrobial molecules combined with vancomycin.

2. INTRODUCTION

Catheter-related bloodstream infection (C-RBSI) is a major cause of morbidity and mortality,

which can increase to 25% in critically ill patients. C-RBSI increases the length of hospital stay and health care costs (1, 2).

C-RBSI is caused by catheter colonization of extraluminal or endoluminal routes during insertion or maintenance (3). Colonization results from the ability of microorganisms to form biofilm. The agents responsible for C-RBSI are as follows: gram-positive cocci, 70% (coagulase-negative staphylococci (4), *Staphylococcus aureus*, enterococci); gram-negative bacilli, 20% (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*); and yeast, 10% (*Candida* spp.) (5, 6).

Guidelines recommend catheter withdrawal when a C-RBSI episode is suspected, particularly when it is caused by *S. aureus* or *Candida* spp. (7, 8). However, catheter salvage is necessary in specific situations, such as absence of an alternative venous access, bleeding disorders, and specific patient conditions (9). In these situations, the main approach to an episode of C-RBSI involves the combination of systemic antimicrobial treatment with antibiotic lock therapy (ALT) (10).

Guidelines recommend vancomycin, a first-generation glycopeptide, as the main choice of treatment for staphylococcal infections (coagu-

lase-negative staphylococcus (4) or *S. aureus* infections) (11, 12). However, several studies demonstrated that the anti-biofilm activity of vancomycin was not as effective as that of other antibiotics used for multidrug-resistant staphylococci (9, 13-15). Wider spread prescription of vancomycin has led vancomycin-intermediate *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) to become increasingly common throughout the world, resulting in frequent treatment failures (16-18).

In their flow biofilm-forming model, Kiamco *et al.* recently demonstrated that the addition of maltodextrin, a common polysaccharide sweetener, can enhance vancomycin activity by acting as a hyperosmotic agent, particularly in VRSA biofilm. Maltodextrin showed synergistic activity that enabled it to be used in the treatment of wound infections (19). Although VRSA will represent a global health challenge in the future, no more than 20 strains have been described worldwide (16, 20, 21). Thus, the combination of vancomycin with agents encouraging antibiotic efficacy should also target vancomycin-susceptible *S. aureus* (VSSA). Moreover, no data have been reported on the possible role of the combination of vancomycin and maltodextrin in ALT solutions.

As for available diagnostic methods to test the *in vitro* metabolic activity of *S. aureus* biofilms, we recently reported a poor correlation between tetrazolium salt (XTT) and resazurin (22). However, to the best of our knowledge, the comparison of these options in susceptibility assays and their correlation with cell viability tests, such as evaluation of colony-forming unit (cfu) counts, have only been assessed for yeasts and not for bacteria (23, 24).

Therefore, the aims of our study were to assess the anti-biofilm activity of the combination of vancomycin with maltodextrin against VSSA and VRSA strains as possible ALT and to evaluate the correlation between the 3 different diagnostic methods.

3. MATERIALS AND METHODS

The study was performed in the laboratory of the Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases at Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain.

We designed a static *in vitro* 96-well plate model using clinical strains of *S. aureus* (4 VSSA and 2 VRSA). The VRSA strains were provided by Haluk Beyer and Cesar A. Arias.

Vancomycin minimal inhibitory concentration value for VRSA-1, VRSA-2, and VSSA strains (mean) was, respectively: >32 mg/L, 5.8 mg/L, and 1.25 mg/L. The design was based on a 24-hour biofilm that was treated with various solutions and the results were

extrapolated to the clinical setting of C-RBSI treatment with ALT.

3.1. Biofilm formation

Biofilm was formed as described by Peeters *et al.*, with some modifications (25). Briefly, a loopful of 24-hour fresh culture of each strain was inoculated in 20 ml of Tryptic Soy Broth (TSB) and incubated at 37°C in an orbital shaker for 24 hours. Inoculums were then washed in 3 centrifuge-resuspension cycles with phosphate-buffered saline (PBS), and pellets were resuspended in 10 ml of TSB. These suspensions were adjusted to 0.5 McFarland turbidity (10⁸ cfu/ml) using a turbidimeter and 100 µl was inoculated onto a 96-well plate. After 24 hours of biofilm formation at 37°C, plates were washed 3 times with PBS and treatment was administered. Each strain was tested in triplicate with a positive control and with TSB as a negative control.

3.2. Vancomycin and maltodextrin solutions and treatment procedure

Vancomycin (Sigma-Aldrich Química, S.L.), maltodextrin (Sigma-Aldrich Química, S.L.), and vancomycin-maltodextrin solutions were prepared in 3% TSB in concentrations of 2 mM, 10 mM, and 2 mM-10 mM, respectively, according to the concentrations used on the paper published by Kiamco *et al.* (19). After preparation, each solution was filtered using a 0.22-µm Millipore® filter. Solutions were prepared immediately before each experiment.

One hundred microliters of each solution was added to the completely dry plates, which were incubated at 37°C for 24 hours. The plates were then washed a further 3 times with PBS and dried at room temperature before the viability assays.

3.3. Quantification of metabolic activity by XTT assay

One hundred microliters of XTT (Sigma-Aldrich Química, S.L.)/menadione (0.5 mg/ml and 1.72 mg/ml) mixed at 10 ml/1 µl was inoculated in each well in darkness. The plate was then incubated at 37°C for 3 hours. Absorbance was measured at 492 nm in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400), and the percentage of metabolic reduction was calculated according to equation 1.

$$\text{Equation 1 } \% \text{ of metabolic reduction} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs}_{492} \text{ treated strain}}{\text{Abs}_{492} \text{ positive control}} \right) \right] * 100$$

3.4. Quantification of metabolic activity by resazurin assay

One hundred microliters of TSB 30 mg/ml and 30 µl of resazurin (Sigma-Aldrich Química, S.L.) 5 ng/

Table 1. Overall percentage reduction in metabolic activity (by XTT or resazurin) and cfu counts for *Staphylococcus aureus* biofilm strains treated with vancomycin, maltodextrin, and the combination of both

Diagnostic assay	Therapy	% Reduction	P value ¹
XTT	V	65.9	p=0.041
XTT	M	33.1	
XTT	V+M	53.4	
RZ	V	62.0	p=0.003
RZ	M	21.0	
RZ	V+M	59.3	
cfu counts	V	77.4	p<0.001
cfu counts	M	41.5	
cfu counts	V+M	73.3	

XTT, tetrazolium salt; RZ, resazurin; cfu, colony-forming unit; V, vancomycin; M, maltodextrin; V+M, vancomycin + maltodextrin. ¹Statistically significant differences were found between V and V+M compared with M alone. V and V+M were efficient against *S. aureus* biofilm using all 3 methods.

µl was added to each well of the plate in darkness and incubated at 37°C for 2 hours. Absorbance was then measured using a dual-wavelength model (570 nm measurement wavelength and 590 nm reference wavelength) in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400). The percentage of metabolic reduction was calculated using equation 2.

$$\text{Equation 2 } \% \text{Resorufin} = \left(\frac{(\epsilon\text{OX})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\epsilon\text{OX})_{\lambda 1} A_{\lambda 2}}{(\epsilon\text{OX})_{\lambda 1} A^{\circ}_{\lambda 2} - (\epsilon\text{OX})_{\lambda 2} A^{\circ}_{\lambda 1}} \right) \cdot 100$$

where $(\epsilon\text{OX})_{\lambda 2}$ is the molar extinction coefficient at 590 nm of the oxidized form, $(\epsilon\text{OX})_{\lambda 1}$ is the molar extinction coefficient at 570 nm of the oxidized form, $A_{\lambda 1}$ and $A_{\lambda 2}$ are the absorbances of treated wells at 570 nm and 590 nm, respectively, and $A^{\circ}_{\lambda 1}$ and $A^{\circ}_{\lambda 2}$ are the absorbances of positive control at 570 nm and 590 nm, respectively.

3.5. Quantification of cfu per well

The wells were vigorously scraped in 100 µl of PBS, and the triplicates of each treatment and controls were mixed separately in a pool. Four 1:100 serial dilutions were performed, and 100 µl of each dilution was streaked on blood agar plates and incubated at 37°C for 24 hours. Colonies were counted, and the reduction in \log_{10} cfu/well was calculated using equation 3.

$$\text{Equation 3 } \% \text{ of viability reduction} = \left[1 - \left(\frac{\text{CFU}_{\text{well treated strain}}}{\text{CFU}_{\text{well positive control}}} \right) \right] \cdot 100$$

3.6. Statistical analysis

The qualitative variables are expressed with their frequency distribution. The quantitative variables are summarized as the mean (SD). Continuous

variables were compared using the *t* test; non-normally distributed variables were compared using the Kruskal-Wallis test. The differences between the groups were compared using the ANOVA test with a post-hoc comparison test by Games-Howell. All statistical tests were 2-tailed.

Bland-Altman plots (95%CI) and the interclass correlation coefficient (ICC) were used to analyze the correlation between the diagnostic methods. A difference in methods of ± 10% of reduction was considered a good correlation. Consistent with Koo *et al.*, ICC values were as follows: low, <0.5; moderate, 0.5<X<0.75; good, 0.75<X<0.9; and excellent, >0.9 (26).

Statistical significance was set at p<0.05 for all the tests. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (IBM Corp, Armonk, New York, USA) and XLSTAT for Windows, Version 2017.4 (Addinsoft).

4. RESULTS

The overall mean (SD) percentage reduction in metabolic activity and mean cfu in all strains when the 3 methods were assessed for vancomycin, maltodextrin, or both were, respectively, 68.4% (17.3%), 31.9% (20.5%), and 62.0% (25.0%) (p<0.05). Data regarding the overall percentage reduction for each method are shown in **Table 1**. Using the XTT assay, the mean (SD) percentage reduction in metabolic activity for vancomycin, maltodextrin, and both were 65.9% (32.7%), 33.1% (26.3%), and 53.4% (35.1%) (p=0.041), respectively. With the resazurin assay, the mean (SD) percentage reduction in metabolic activity was 62% (22.3%), 21% (8.3%), and 59.3% (21.7%)

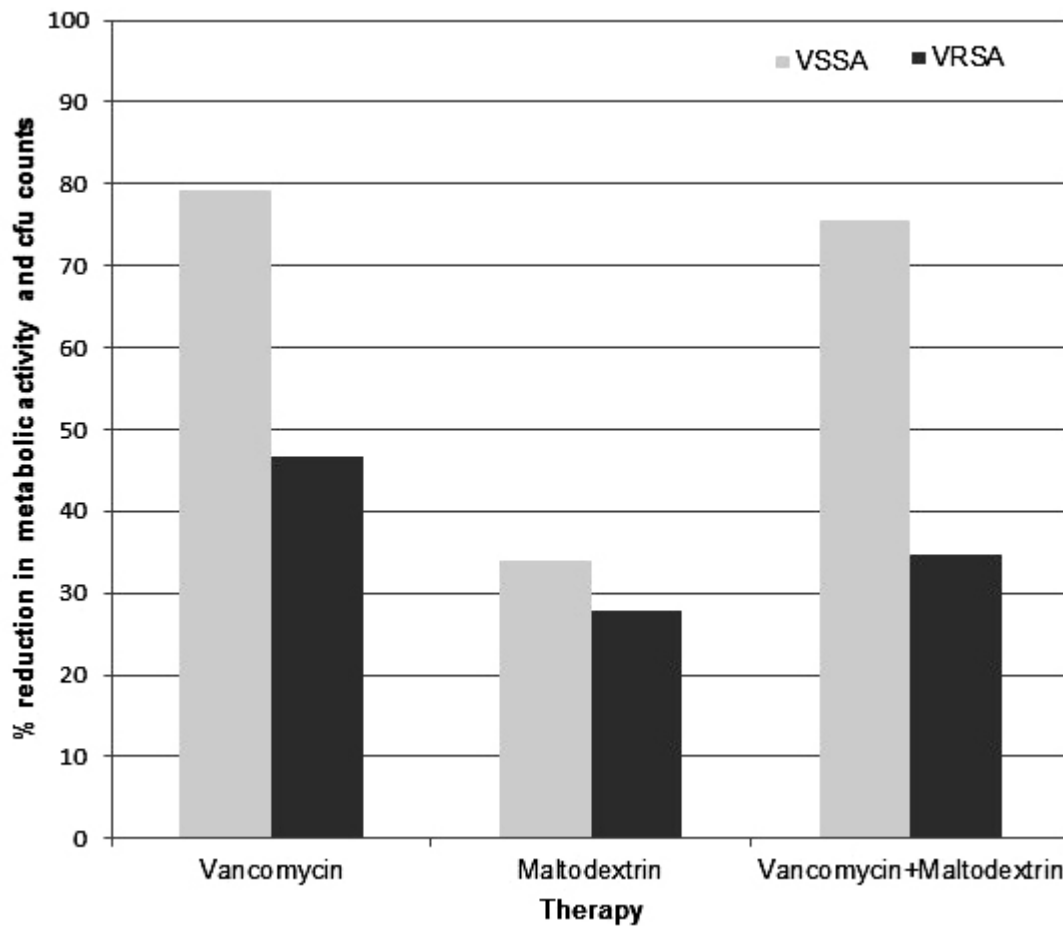


Figure 1. Overall percentage reduction in metabolic activity and cfu counts for VSSA and VRSA strains treated with vancomycin, maltodextrin, and their combination

($p=0.003$) for vancomycin, maltodextrin, and both. The mean (SD) percentage reduction in cfu counts for vancomycin, maltodextrin, and both was, respectively, 77.4% (20.8%), 41.5% (22.0%), and 73.3% (23.9%) ($p<0.001$).

For VSSA strains, the overall mean (SD) percentage reduction in metabolic activity and cfu for vancomycin and the combination of vancomycin with maltodextrin was statistically significant compared with that of maltodextrin alone: 79.3% (9.0%) and 75.7% (15.6%) vs. 34.0% (9.3%), $p<0.05$ (Figure 1). In contrast, in VRSA strains, the overall mean (SD) percentage reduction in metabolic activity and cfu counts was not statistically significant between the groups: vancomycin, 46.7% (28.9%); maltodextrin, 27.8% (16.2%); and both, 34.6% (18.9%); $p>0.05$.

Figure 2. shows the percentage reduction for each therapy by the 3 different diagnostic methods for VSSA (2a) and VRSA (2b). No differences were found between vancomycin and its combina-

tion with maltodextrin in VSSA ($p>0.05$), although it was more active than maltodextrin alone ($p<0.001$). In VRSA, vancomycin led to a greater reduction in metabolic activity and cfu counts than the other therapies, although the differences were not statistically significant ($p>0.05$).

When we compared the correlation between the 3 methods used, no statistically significant correlation was found between any of the methods, either with the Bland-Altman graphs or ICCs (Figure 3). The ICC for the combinations was as follows: cfu vs. XTT, 0.53; cfu vs. resazurin, 0.69; and XTT vs. resazurin, 0.63, ie, a moderate correlation between the 3 techniques.

5. DISCUSSION

Our static *in vitro* biofilm model did not enable us to demonstrate that the combination of maltodextrin with vancomycin had a synergistic effect against VSSA and VRSA strains.

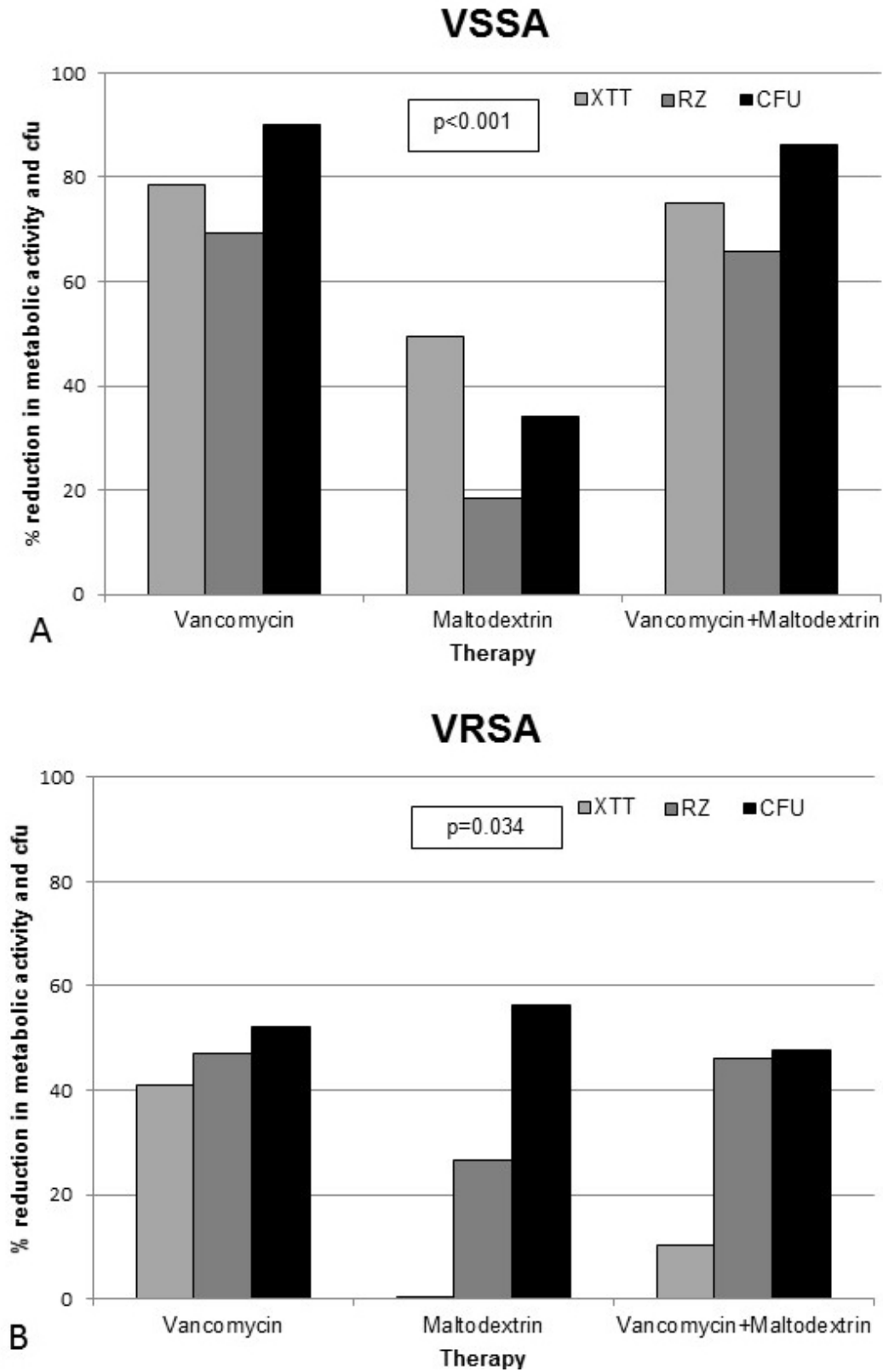


Figure 2. Percentage reduction in metabolic activity (by XTT or resazurin) and cfu counts for VSSA (A) and VRSA (B) strains treated with vancomycin, maltodextrin, and their combination. A. In VSSA, vancomycin alone and in combination with maltodextrin showed statistically significantly greater reduction in metabolic activity and cfu counts than maltodextrin alone ($p < 0.001$). B. In VRSA, the only statistically significant difference was found between maltodextrin and the combination of both using the resazurin assay ($p = 0.012$).

S. aureus biofilm and maltodextrin

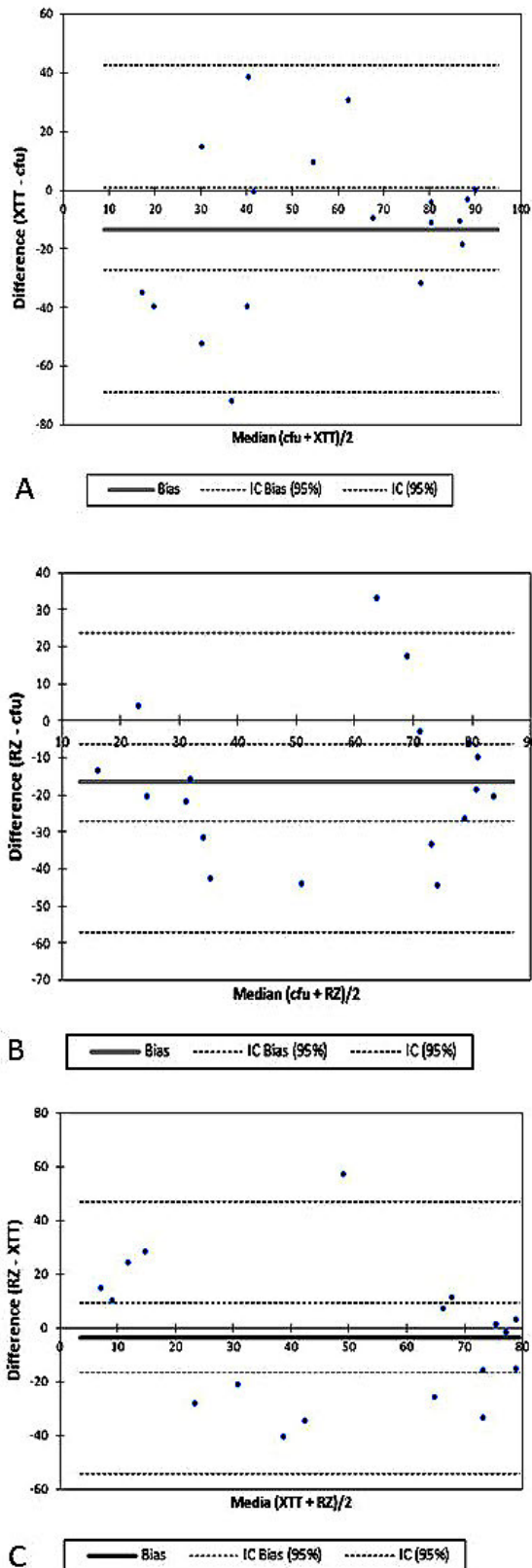


Figure 3. Bland-Altman plots for cfu counts vs. XTT (A), cfu counts vs. resazurin (B), and XTT vs. resazurin (C). XTT, tetrazolium salt; RZ, resazurin; cfu, colony forming units.

C-RSBI is a major complication in hospitals, particularly in intensive care units (3, 27). *S. aureus* C-RSBI is an issue of concern because it frequently causes long-term hospitalization, morbidity, and mortality (28). A relationship was recently reported between high minimal inhibitory concentrations (MICs) for vancomycin (MICs ≥ 1.5 $\mu\text{g/ml}$) and poor clinical outcome in patients with *S. aureus* C-RSBI (29, 30). Moreover, the anti-biofilm activity of vancomycin compared with other antibiotics in the clinical setting is also under discussion, and the use of the drug for ALT remains controversial (31). Thus, our purpose was to analyze whether the combination of vancomycin with a hyperosmotic agent increased its activity against *S. aureus* biofilm sufficiently to be used in ALT.

Kiamco *et al.* described a synergistic effect of 10 mM maltodextrin combined with 2 mM vancomycin against *S. aureus* biofilm, with a significant reduction in volumetric biofilm coverage and average diffusion distance. The authors also observed changes in biofilm morphology and in oxygen penetration, concluding that the combination of vancomycin and maltodextrin increased the efficiency of biofilm treatment in wound infections (19). In contrast, we found no statistically significant differences for the efficacy of vancomycin, whether alone or combined with maltodextrin, in reducing metabolic activity and cfu counts in VSSA or in VRSA biofilms. Although we used the same concentrations as Kiamco *et al.*, the diagnostic methods for each study were different (19). While we used a static plate model and cell viability assays to analyze viability and metabolic reduction, Kiamco *et al.* used a single-pass flat plate flow reactor to assess biofilm structure, oxygen penetration, antibiotic diffusion, and cell viability. Thus, vancomycin combined with maltodextrin altered various biofilm properties but did not increase vancomycin activity when metabolic activity was being measured. We found that in VSSA, the reduction in viability measured as cfu counts was approximately 80-90% for vancomycin and for the combination of vancomycin and maltodextrin.

These findings correlated with the results of Kiamco *et al.* and indicate that both therapies are effective but that the combination of vancomycin and maltodextrin was not synergistic. In contrast, in VRSA, none of the therapies enabled a reduction greater than 52% with any of the diagnostic methods used or even showed less activity when both were combined.

Moreover, the antimicrobial susceptibility profile and the level of biofilm production can affect the efficacy of an antimicrobial treatment. A possible explanation of the differences we observed with respect to Kiamco's study in the efficacy of the combined activity of vancomycin+maltodextrin could be related to a specie-specific background. In particular, a high level of biofilm production is key in the process of the bacte-

rial tolerance. Is it possible that the absence of a statistical significance observed in our VRSA could be related to a different level of biofilm production between our strains and the one analyzed in Kiamco *et al.*

As resazurin is cheaper, less time-consuming, less toxic than XTT, and less laborious than cfu counts and the XTT assay is less time-consuming, provides faster results, and is less laborious than cfu counts, we aimed to find a correlation that could substitute cfu counts with any of the metabolic activity assays. However, as reported for yeasts (25, 32-34), we were unable to establish a correlation between cfu counts, XTT, and resazurin using either Bland-Altman plots or ICCs in bacteria.

Nevertheless, considering a $\pm 10\%$ reduction in the difference between methods as a good correlation, the correlation we obtained between the methods was moderate, suggesting that, depending on the researcher's goals, some methods are more suitable than others. However, results must be interpreted with caution.

In conclusion, based on our results in a static *in vitro* model, we could not demonstrate that maltodextrin improved the activity of vancomycin against *S. aureus* biofilm in ALT. As for diagnostic methods, neither XTT nor resazurin can replace cfu counts for the evaluation of anti-biofilm activity, as they measure different properties (metabolic activity and cell viability, respectively). Future studies are needed to find other synergistic agents to increase vancomycin anti-biofilm activity and thus optimize the conservative treatment of C-RBSI by ALT.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors declare that they have no conflicts of interest. We thank Thomas O'Boyle for his help on the preparation of the manuscript. M. Gueembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII-MICINN, CP13/00268) from the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain. Beatriz Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0406). The study was partially financed by the European Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe" and by grants from the Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM). We thank Dr. Haluk Beyenal and Dr. Cesar A. Arias for providing the VRSA strains.

7. REFERENCES

1. DS. Duzkaya, NC. Sahiner, G. Uysal, T. Yakut, A. Citak. Chlorhexidine-Impregnated

Dressings and Prevention of Catheter-Associated Bloodstream Infections in a Pediatric Intensive Care Unit. *Crit Care Nurse* 36, e1-e7 (2016)
DOI: 10.4037/ccn2016561
PMid:27908954

2. A. Atilla, Z. Doganay, H. Kefeli Celik, MD. Demirag. Central line-associated bloodstream infections: characteristics and risk factors for mortality over a 5.5.-year period. *Turk J Med Sci* 47, 646-652 (2017)
DOI: 10.3906/sag-1511-29
PMid:28425261
3. M. Gominet, F. Compain, C. Beloin, D. Lebeaux. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *Apmis* 125, 365-375 (2017)
4. JB. Dimick, RK. Pelz, R. Consunji, SM. Swoboda, CW. Hendrix, PA. Lipsett. Increased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit. *Arch Surg* 136, 229-34 (2001)
DOI: 10.1001/archsurg.136.2.229
PMid:11177147
5. R. Gahlot, C. Nigam, V. Kumar, G. Yadav, S. Anupurba. Catheter-related bloodstream infections. *Int J of Crit Illness and Inj Science* 4, 162-167 (2014)
6. H. Shah, W. Bosch, KM. Thompson, WC. Hellinger. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection. *The Neurohosp* 3, 144-151 (2013)
DOI: 10.1177/1941874413476043
PMid:24167648 PMCID:PMC3805442
7. LA. Mermel, M. Allon, E. Bouza, DE. Craven, P. Flynn, NP. O'Grady, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 49, 1-45 (2009)
DOI: 10.1086/599376
PMid:19489710 PMCID:PMC4039170
8. NP. O'Grady, M. Alexander, LA. Burns, EP. Dellinger, J. Garland, SO. Heard, Lipsett PA, Masur H, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph AG, Rupp ME, Saint S; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guidelines for the

- prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 52, e162-e193 (2011)
DOI: 10.1093/cid/cir257
DOI: 10.1093/cid/cir138
9. S. Hogan, M. Zapotoczna, NT. Stevens, H. Humphreys, JP. O'Gara, E. O'Neill. *In vitro* Approach for Identification of the Most Effective Agents for Antimicrobial Lock Therapy in the Treatment of Intravascular Catheter-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 2923-31 (2016)
DOI: 10.1128/AAC.02885-15
PMid:26926633 PMCID:PMC4862522
 10. SG. Woo, SY. Lee, SM. Lee, KH. Lim, EJ. Ha, YB. Eom. Activity of novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Folia Microbiol (Praha)* (2016)
 11. RP. Dash, RJ. Babu, NR. Srinivas. Review of the pharmacokinetics of dalbavancin, a recently approved lipoglycopeptide antibiotic. *Infect Dis (Lond)* 49, 483-492 (2017)
DOI: 10.1080/23744235.2017.1296968
PMid:28264598
 12. HP. Rang, RJ. Flower, G. Henderson, J. Ritter. Rang and Dale's pharmacology. Eighth edition ed. (Edinburgh): Elsevier Churchill Livingstone (2016)
 13. W. Siala, MP. Mingeot-Leclercq, PM. Tulkens, M. Hallin, O. Denis, F. Van Bambeke. Comparison of the antibiotic activities of Daptomycin, Vancomycin, and the investigational Fluoroquinolone Delafloxacin against biofilms from *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 6385-97 (2014)
DOI: 10.1128/AAC.03482-14
PMid:25114142 PMCID:PMC4249400
 14. SS. Atshan, M. Nor Shamsudin, LT. Lung, Z. Sekawi, C. Pei Pei, A. Karunanidhi, J. Jeevajothei Nathan, A. Mateg Ali, E. Ghaznavi-Rad, SA. Abduljaleel, R. Awang Hamat. Genotypically different clones of *Staphylococcus aureus* are diverse in the antimicrobial susceptibility patterns and biofilm formations. *Biomed Res Int* 2013;515712 (2013)
 15. K. Smith, CG. Gemmell, S. Lang. Telavancin shows superior activity to vancomycin with multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in a range of *in vitro* biofilm models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 1327-32 (2013)
DOI: 10.1007/s10096-013-1883-z
PMid:23624635
 16. IM. Gould. Treatment of bacteraemia: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) *Int J Antimicrob Agents* 42, S17-21 (2013)
 17. S. Gardete, A. Tomasz. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 124, 2836-40 (2014)
DOI: 10.1172/JCI68834
PMid:24983424 PMCID:PMC4071404
 18. B. Périchon, P. Courvalin. *Staphylococcus aureus* VRSA-11B Is a Constitutive Vancomycin-Resistant Mutant of Vancomycin-Dependent VRSA-11A. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4693-4696 (2012)
DOI: 10.1128/AAC.00454-12
PMid:22710116 PMCID:PMC3421854
 19. MM. Kiamco, E. Atci, QF. Khan, A. Mohamed, RS. Renslow, N. Abu-Lail, BA. Fransson, DR. Call, H. Beyenal. Vancomycin and maltodextrin affect structure and activity of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biotechnol Bioeng* 112, 2562-70 (2015)
DOI: 10.1002/bit.25681
PMid:26084588 PMCID:PMC5096838
 20. A. Moses, U. Uchenna, O. Nworie. Epidemiology of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates in a tertiary hospital in Abakaliki, Nigeria. *Am J of Epidemiol and Infect Dis* 1, 24-26 (2013)
 21. VS. Albrecht, MJ. Zervos, KS. Kaye, PK. Tosh, S. Arshad, K. Hayakawa, AJ. Kallen, LK. McDougal, BM. Limbago, AY. Guh. Prevalence of and risk factors for vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* precursor organisms in Southeastern Michigan. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35, 1531-4 (2014)
DOI: 10.1086/678605
DOI: 10.1086/593316
PMid:25419776
 22. B. Alonso, R. Cruces, A. Perez, C. Sanchez-Carrillo, M. Guembe. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Microbiol Methods* 139, 135-137 (2017)
DOI: 10.1016/j.mimet.2017.06.004
PMid:28587857

23. PD. Khot, PA. Suci, BJ. Tyler. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: assessment using metabolic assays and colony forming units. *J Microbiol Methods* 72, 268-74 (2008)
DOI: 10.1016/j.mimet.2007.12.005
PMid:18234380
24. S. Silva, M. Henriques, R. Oliveira, D. Williams, J. Azeredo. *In vitro* biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol* 61, 534-40 (2010)
DOI: 10.1007/s00284-010-9649-7
PMid:20401483
25. E. Peeters, HJ. Nelis, T. Coenye. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72, 157-65 (2008)
DOI: 10.1016/j.mimet.2007.11.010
PMid:18155789
26. TK. Koo, MY. Li. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med* 15, 155-63 (2016)
DOI: 10.1016/j.jcm.2016.02.012
PMid:27330520 PMCID:PMC4913118
27. BR. Salonen, SL. Bonnes, N. Vallumsetla, JE. Varayil, MS. Mundi, RT. Hurt. A prospective double blind randomized controlled study on the use of ethanol locks in HPN patients. *Clin Nutr May* (2017)
28. R. San-Juan, M. Fernández-Ruiz, O. Gasch, M. Camoez, F. López-Medrano, M. Domínguez, B. Almirante, B. Padilla, M. Pujol, JM. Aguado; REIPI/GEIH Study Group. High vancomycin MICs predict the development of infective endocarditis in patients with catheter-related bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 72, 2102-2109 (2017)
DOI: 10.1093/jac/dkx096
PMid:28379553
29. DM. Martirosov, MR. Bidell, MP. Pai, MH. Scheetz, SL. Rosenkranz, TP. Lodise. Relationship between vancomycin exposure and outcomes among patients with MRSA bloodstream infections with vancomycin Etest(R) MIC values of 1.5mg/L: A pilot study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 88, 259-263 (2017)
DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.008
PMid:28449844
30. A. Soriano, F. Marco, JA. Martinez, E. Pisos, M. Almela, VP. Dimova, D. Alamo, M. Ortega, J. Lopez, J. Mensa. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 46, 193-200 (2008)
DOI: 10.1086/524667
PMid:18171250
31. S. Deresinski. Counterpoint: Vancomycin and *Staphylococcus aureus*--an antibiotic enters obsolescence. *Clin Infect Dis* 15, 1543-8 (2007)
DOI: 10.1086/518452
PMid:17516396
32. AG. Dalecki, CL. Crawford, F. Wolschendorf. Targeting Biofilm Associated *Staphylococcus aureus* Using Resazurin Based Drug-susceptibility Assay. *J Vis Exp* 5, 111 (2016)
33. MM. Tunney, G. Ramage, TR. Field, TF. Moriarty, DG. Storey. Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1879-81 (2004)
DOI: 10.1128/AAC.48.5.1879-1881.2004
PMid:15105149 PMCID:PMC400562
34. K. Prabst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, H. Hubner. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol* 1601, 1-17 (2017)
DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1
PMid:28470513

Key Words: Biofilm, Catheter-Related Bloodstream Infection, Lock Therapy, Maltodextrin, Vancomycin, Metabolic Activity, *Staphylococcus Aureus*

Send correspondence to: Maria Guembe, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", C/. Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain, Tel: 34- 91- 586 80 27, Fax: 34- 91- 586 86 67, E-mail: mariaguembe@hotmail.com



The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: an in-vitro study

B. Alonso^{a,b}, M.J. Pérez-Granda^{a,c,d}, A. Rodríguez-Huerta^e, C. Rodríguez^{a,f}, E. Bouza^g, M. Guembe^{a,b,*}

^a Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^b Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c Cardiac Surgery Postoperative Care Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^d CIBER Enfermedades Respiratorias – CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain

^e Hematology Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^f Pharmacy Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^g Microbiology Department, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2018

Accepted 4 April 2018

Available online 10 April 2018

Keywords:

Ethanol

Lock therapy

Anti-biofilm activity

Heparin



SUMMARY

Background: Ethanol-based lock therapy (LT) solutions are used as an alternative to antibiotics for the conservative management of catheter-related bloodstream infection. However, no clear consensus on regimen or dose has been reached.

Aim: To find the ethanol-based lock solution containing a sufficiently low concentration of ethanol for reduction of the metabolic activity of bacterial and fungal biofilms.

Methods: Using an in-vitro model, three concentrations of ethanol (25%, 40%, 70%) were tested, with and without 60 IU of heparin, at six different time-points and against 24 h preformed biofilms of *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* (clinical isolate), *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Candida albicans* ATCC14058, and *Escherichia coli* ATCC25922. The reduction in the metabolic activity of the biofilm was measured using the tetrazolium salt assay and LT was considered to be successful when metabolic activity fell by >90%. Regrowth inhibition was then tested within 24 h and seven days after each LT regimen only at the ethanol concentration of the most successful LT regimen.

Findings: The most successful LT was achieved with 40% ethanol + 60 IU of heparin only at 24, 72, and 24 h for seven-day regimens ($P < 0.05$). However, none of the regimens reached 45% RI within seven days of therapy.

Conclusion: According to our in-vitro data, an ethanol-based lock solution with 40% ethanol + 60 IU heparin administered daily for 72 h is sufficient to almost eradicate the metabolic activity of bacterial and fungal biofilms. Future studies are needed to study cell regrowth after LT.

© 2018 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Address: Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario 'Gregorio Marañón', C/. Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 586 80 27; fax: +34 91 586 86 67.

E-mail address: mariaguembe@hotmail.com (M. Guembe).

Introduction

Catheter-related bloodstream infection (CRBSI) is one of the most common nosocomial infections. Its incidence is approximately of two episodes per 1000 catheter-days and it is associated with high rates of morbidity and mortality (12.5–25%), high associated costs (€18,000), and increased length of stay [1–4]. Gram-positive cocci are the main causative micro-organisms (70%), followed by Gram-negative bacilli (20%), and *Candida* spp. (10%) [5,6]. The ability of micro-organisms to colonize central venous catheters lies in their capacity to adhere to the catheter surface and form a biofilm, which causes persistent infections and treatment failure [7–9].

When CRBSI is suspected, guidelines recommend catheter withdrawal [5,10]. However, in specific situations, such as chemotherapy or haemodialysis, where the risks of catheter removal are higher than the benefits, the catheter must be retained using antimicrobial lock therapy in addition to systemic treatment [10–13]. The increasing rate of antimicrobial resistance and the low antibiofilm activity of some antimicrobials necessitate the search for alternative therapies [14]. Ethanol lock therapy (LT) has been widely used for prophylactic purposes, although results show that it is not sufficiently successful [2,15–17]. Nevertheless, when used for the treatment of CRBSI, it yields promising results [18–20].

Although some tolerance to ethanol has been reported, no resistance has been observed, and its antibiofilm activity has been demonstrated worldwide [21,22]. However, dose, adverse effects, and use of concomitant anticoagulants for lock therapies of ≥ 24 h remain controversial.

In this study an in-vitro model was used to determine an optimal LT regimen that contained a sufficiently low concentration of ethanol to reduce bacterial and fungal biofilms without inactivating heparin.

Methods

Three different concentrations of ethanol (25%, 40%, and 70%) were tested alone and in combination with 60 IU of heparin, in six different LT regimens (2, 24, 72, and 2 h for three

days; 2 for seven days; and 24 h for seven days) against 24 h preformed biofilms of *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* (clinical isolate), *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Candida albicans* ATCC14058, and *Escherichia coli* ATCC25922. The reduction in metabolic activity of the biofilms was measured using the tetrazolium salt assay (XTT). In order to reduce almost all metabolic activity of the biofilm to assure microbial killing, we considered LT successful when metabolic activity fell by $\geq 90\%$.

We then tested regrowth inhibition (RI) within 24 h and seven days after each LT regimen, at the ethanol concentration at which LT was most successful, and heparin was only added for >2 h therapies (Figure 1).

Biofilm formation

Biofilms were grown as described elsewhere with some modifications [23]. Briefly, a loopful of fresh culture of each strain was inoculated in 20 mL of medium as follows: tryptic soy broth (TSB) for *S. aureus*, TSB supplemented with 1% of glucose (w/w) for *S. epidermidis* and *E. faecalis*, yeast peptone dextrose for *C. albicans*, and Luria–Bertani broth for *E. coli* [24–27]. Each suspension was incubated at 30°C for 24 h with shaking. Each inoculum was adjusted to a specific McFarland value: 0.5 McFarland in the case of bacteria (10^8 cfu/mL) and 0.35 McFarland in the case of yeasts (10^6 cfu/mL). Next, 100 μ L of each suspension was placed in a polypropylene 96-well microtitre plate. Plates were incubated at 37°C for 24 h without shaking. Plates were then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS).

Ethanol-based treatment

Completely dry plates were exposed to 25%, 40%, and 70% ethanol alone and in combination with 60 IU of heparin (heparin sodium, 5000 IU/5 mL, Hospira Prod. Farm. y Hosp, S.L.) following standard practice at our institution for catheter lock, with the following regimens: single dose for 2 h, 24 h and continuous doses for 72 h, 2 h for 3 days (2 h of ethanol and 22 h of fresh medium), 2 h for seven days, and 24 h for seven days

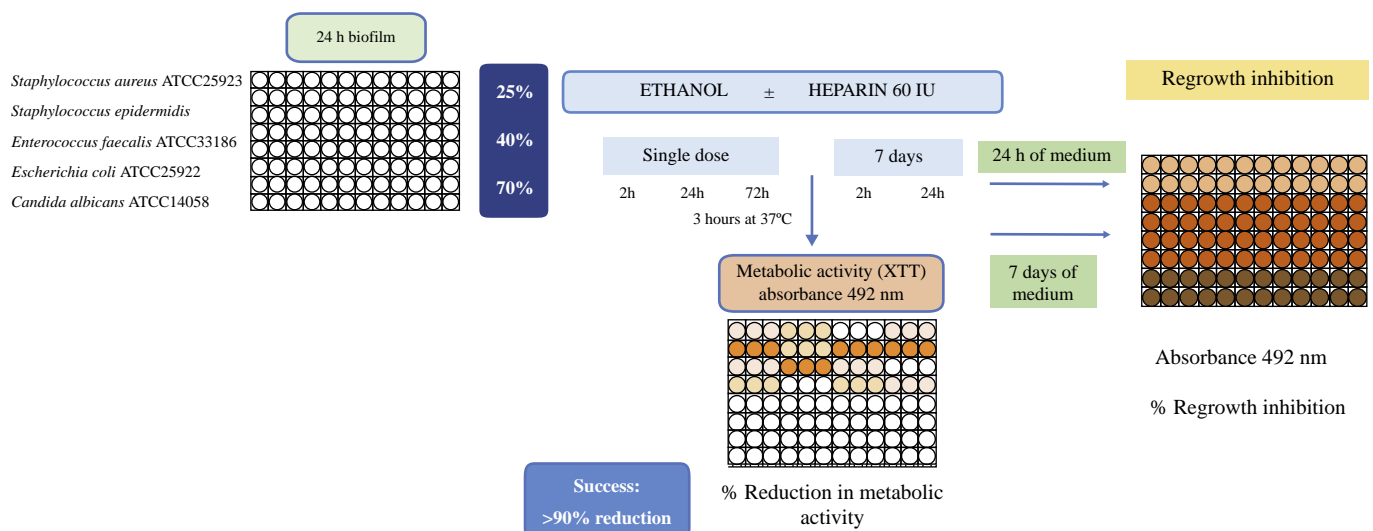


Figure 1. Study procedure.

continuously replacing the medium every 24 h. Ethanol alone was used for 2 h therapies, whereas solutions of ethanol with 60 IU of heparin were used for therapies of ≥ 24 h. After each treatment, plates were incubated at 37°C.

The final volume per well was 240 μL (120 μL of LT solution + 120 μL of medium) in the case of treated wells and 120 μL of medium per well for positive and negative controls. Additionally, the efficacy of those solutions combined with 25%, 40%, and 70% isopropanol (in proportion 1:1) was also tested in order to corroborate the hypothesis of Restrepo *et al.* and Cullis *et al.* with respect to inhibition of heparin precipitation when mixed with ethanol (data not shown) [28,29].

All experiments were run six times and solutions and fresh medium were replaced every 24 h.

Assessment of metabolic activity

Metabolic activity was measured using the tetrazolium salt assay (XTT) immediately after ethanol therapy and when wells had been washed with PBS and dried. One hundred microlitres of a premixed solution of XTT/menadione at 10 mL/40 μL was added to each well and incubated at 37°C for 3 h in darkness. Absorbance was measured at 492 nm using a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400; Biochrom Ltd, Cambridge, UK). The percentage reduction in metabolic activity was calculated using Equation 1:

$$\% \text{ reduction} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{492} \text{ treated sample}}{\text{Abs}_{492} \text{ positive control}} \right) * 100 \quad (1)$$

Treatment was considered to be successful when metabolic activity fell by $\geq 90\%$.

Regrowth inhibition assay

As described above, RI was only tested at the lowest concentration of ethanol that was most successful at reducing metabolic activity. Hence, it was decided to add heparin for those regimens of > 2 h of locking only in regrowth assays. When all therapy regimens (2, 24, 72, and 2 h for 3 days; 2 h for seven days; 24 h for seven days) had been completed, 100 μL of medium was added to each well and incubated at 37°C for 24 h and seven days (the medium was replaced every 24 h). RI was also assessed within 24 h and seven days after 2 and 24 h LT on alternate days for seven days. The results were not satisfactory (data not shown).

All experiments were performed 24 times for each strain, and solutions were replaced every 24 h.

Absorbance was measured at 492 nm in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400), and the percentage RI was calculated using Equation 2:

$$\% \text{ regrowth inhibition} = \left(\frac{\text{Abs}_{492} \text{ positive control} - \text{Abs}_{492} \text{ treated sample}}{\text{Abs}_{492} \text{ positive control}} \right) * 100 \quad (2)$$

Anti-Xa assay

A pool of plasma from patients with normal coagulation values was collected and frozen at -80°C . Alcohol (ethanol and isopropanol) solutions of 25%, 40%, and 70% mixed with 60 IU of heparin were prepared and stored at 37°C for 2, 24, and 72 h.

Plasma was thawed at room temperature, and 1 mL was added to each alcohol solution at the time of analysis. A solution comprising 60 IU of heparin and water was used as a control.

These mixtures were placed in an automated machine where anti-Xa reagent (HemosIL[®] Liquid Anti-Xa) was added and absorbance was measured at 405 nm. The results of heparin activity were reported as IU/mL.

Data analysis

Data are expressed as mean (SD) percentage reduction in metabolic activity and mean (SD) percentage RI. Differences between each therapy group were compared using analysis of variance and a Dunnett post-hoc test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Reduction in the metabolic activity of biofilms after ethanol lock therapy

The overall results for each therapy and each micro-organism are shown in Figure 2.

Solutions containing 25% ethanol were variable between regimens and micro-organisms. Due to this variability we considered that solutions of 25% ethanol alone or combined with 60 IU of heparin were not successful enough in any regimen or against any micro-organism.

The most successful LT regimen containing the lowest ethanol concentration was achieved with 40% ethanol alone against all micro-organisms in each regimen except for *S. aureus* in single dose 2 h regimen ($P < 0.05$). By contrast, 40% ethanol + 60 IU of heparin was successful only at single dose for 24, 72, and 24 h for seven days continuously ($P < 0.05$). All solutions with 70% ethanol, whether alone or in combination with heparin, reached $> 90\%$ reduction in metabolic activity ($P < 0.05$) (Figure 3). However, no statistically significant differences were found between 40% ethanol and 70% ethanol solutions for the mean (SD) percentage reduction in metabolic activity ($P = 0.08$).

Regrowth inhibition

As the lowest concentration of ethanol able to reduce $> 90\%$ metabolic activity of bacterial and fungal biofilm was 40% ethanol alone for 2 h, and 40% ethanol + 60 IU of heparin for ≥ 24 h, only these regimens were tested in the RI assay, and only by adding heparin at the treatments of > 2 h.

Global mean (SD) percentages of RI are shown in Table I. The regimen showing the best percentages of RI ($\geq 66.6\%$) for all micro-organisms within 24 h after therapy was 72 h ($P > 0.05$). However, none of the regimens reached 45% of RI within seven days of therapy (Table I).

Heparin activity

Figure 4 shows values of activity for heparin (IU/mL) when mixed with 25%, 40%, and 70% ethanol for 0, 2, 24, and 72 h. There were no statistically significant differences between 25% or 40% ethanol solutions and the control (heparin alone).

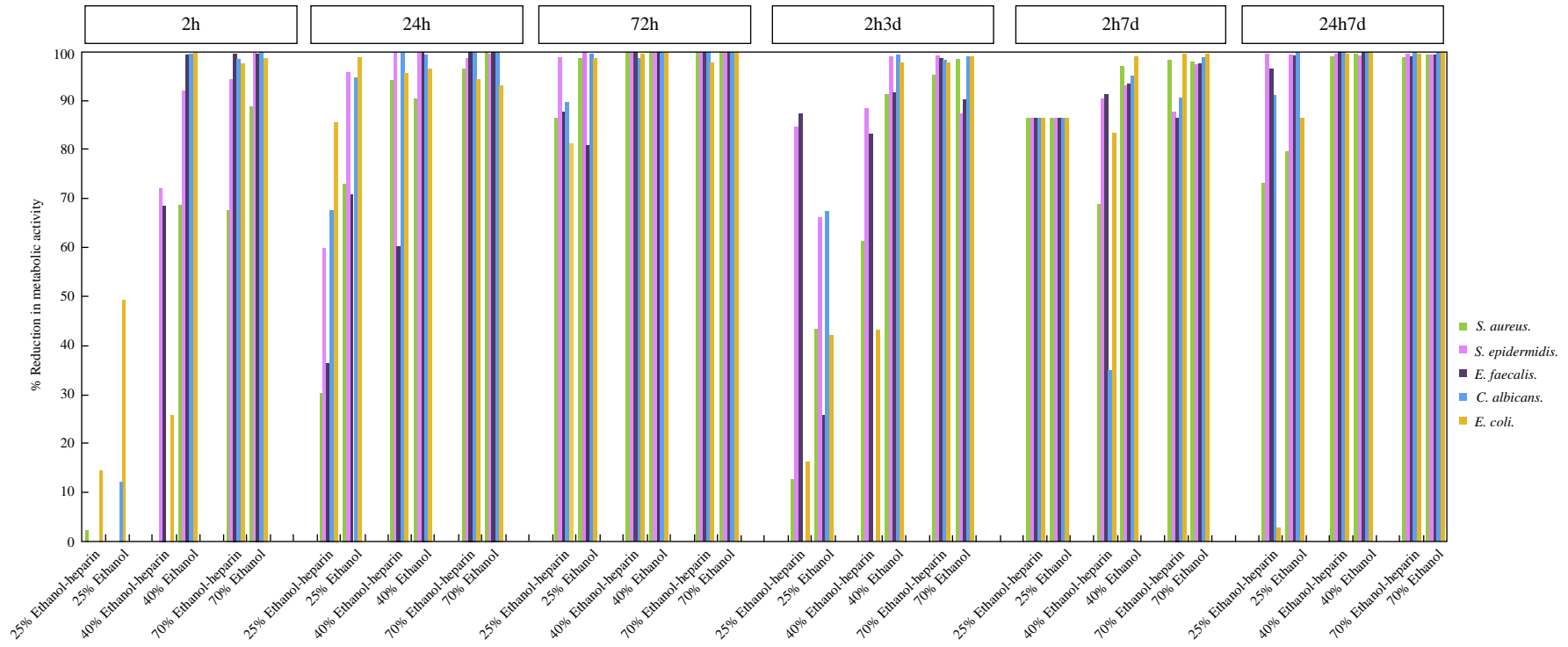


Figure 2. Overall results of percentage reduction in metabolic activity after ethanol lock therapy for 24 h biofilms of *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* (clinical isolate), *Enterococcus faecalis* ATCC33186, *Candida albicans* ATCC14058, and *Escherichia coli* ATCC25922. 2h3d, 2 h for three days; 2h7d, 2 h for seven days; 24h7d, 24 h for seven days.

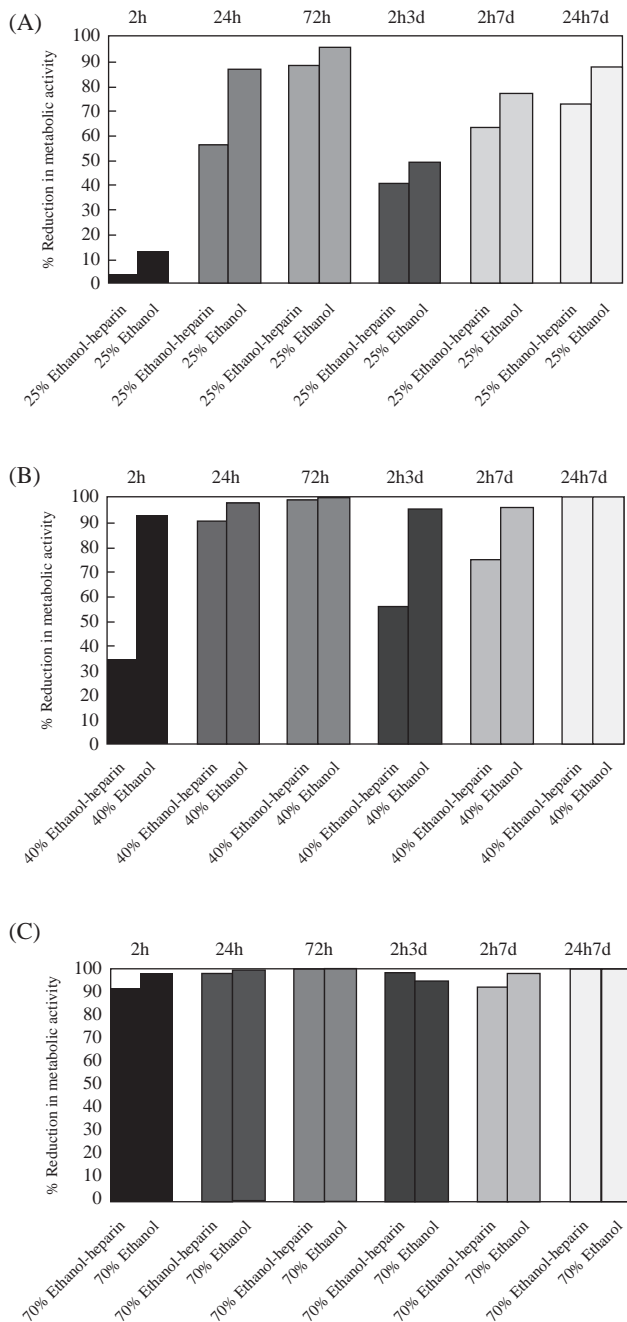


Figure 3. Overall percentage reduction in metabolic activity at each ethanol concentration. (A) 25%; (B) 40%; (C) 70%. 2h3d, 2 h for three days; 2h7d, 2 h for seven days; 24h7d, 24 h for seven days.

However, a reduction of 2 IU/mL in heparin activity was observed in 70% ethanol solution for all incubation periods.

Discussion

This study demonstrated that an ethanol-based lock solution containing 40% ethanol + 60 IU of heparin administered for 72 h is sufficient for a >90% reduction in the metabolic activity of biofilm of five of the most common micro-organisms

responsible for CRBSI. However, RI was not successfully achieved within seven days after lock therapy.

CRBSI is a major healthcare-associated, biofilm-related infection, with high morbidity and mortality rates, whose prevention gives cause for concern throughout the world [7,22,30–32]. Despite recommendations in guidelines to remove the catheter when CRBSI is suspected, conservative management is possible in specific situations where catheter replacement is more a risk than a benefit [5,10,12,13].

Conservative management of CRBSI is based on the use of antibiotic/antiseptic lock solutions administered through the catheter lumen in addition to systemic treatment [10,11]. Consequently, the ready availability and low cost of ethanol make it an attractive option for LT [33]. Moreover, no resistance to ethanol has been described compared to current therapies with antibiotics [29,34]. Widely varying success rates have been reported for prophylactic LT, and many adverse effects have been described in clinical trials using 70% ethanol solutions [17,18,35,36]. However, few studies are based on treatment of CRBSI. Blackwood *et al.* demonstrated that a heparin-free 70% ethanol solution reached a catheter salvage rate of 86.7% in paediatric patients [37]. Valentine *et al.* showed a catheter salvage success rate of 92% in a paediatric population after 17 h of 70% ethanol LT [38]. However, both studies used 70% ethanol, and adults were not included.

Therefore, it is necessary to find ethanol-based lock solutions that contain concentrations that are as low as possible but sufficient to reduce biofilm formation. Furthermore, the addition of an anticoagulant is used to maintain catheter patency but its compatibility with ethanol is also controversial [39]. Ours is the first in-vitro study to analyse the effect of 25%, 40%, and 70% ethanol solutions in several regimens for reducing the metabolic activity of preformed biofilms and to assess the RI >24 h of the main micro-organisms responsible for CRBSI.

Hogan *et al.* showed that $\geq 7.5\%$ ethanol solution was the most effective agent in eradicating *S. aureus* biofilm compared with other antiseptic and antibiotic solutions [40]. Qu *et al.* reported that 60–80% ethanol killed biofilm cells within 1 min of exposure in coagulase-negative staphylococci, 40% ethanol in 1 h, and 20% ethanol in >1 h [41]. By contrast, we found that 25% ethanol was not sufficient to reduce metabolic activity by >50%. Furthermore, it took 2 h to obtain a $\geq 90\%$ reduction in metabolic activity with 40% ethanol for *S. epidermidis*, thus demonstrating that ethanol activity is concentration and time dependent. We considered that 25% ethanol, both alone and in combination with heparin, should not be used as lock therapy owing to its low efficacy and the differences found between in-vitro studies. Furthermore, compared with positive controls, we obtained lower rates of reduction in metabolic activity in *S. aureus* and *S. epidermidis* biofilms after exposure to 25% ethanol solutions both with and without heparin, as reported elsewhere, possibly because the extracellular matrix of the biofilm prevents ethanol from diffusing into the inner biofilm layers, thus decreasing the concentration of ethanol that can reach these cells [42–45]. We maintain that this sublethal concentration of disinfectant may be upregulating the *ica* gene cluster, as previously reported [42,43,46]. Another phenomenon described in the literature is the stimulation of staphylococcal biofilm formation by heparin through promotion of cell–cell interaction, suggesting that heparin lock alone should not be the first choice for catheter maintenance [47]. In line with the hypothesis of Shanks *et al.*, we also observed that

Table 1

Regrowth inhibition within 24 h and seven days after 40% ethanol lock therapy, alone and in combination with 60 IU of heparin

Assessment time/micro-organism	% regrowth inhibition				
	2 h		24 h		72 h
	Single dose	7 days	Single dose	7 days	
Within 24 h after therapy					
<i>Staphylococcus aureus</i>	65.3 (27.0)**	57.4 (25.6)**	91.0 (3.0)***	49.1 (27.1)**	94.6 (5.5)***
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50.3 (19.8)**	75.6 (12.3)***	99.5 (0.9)***	75.8 (14.3)***	70.4 (18.5)***
<i>Enterococcus faecalis</i>	72.9 (18.9)***	73.2 (23.1)***	69.2 (14.8)***	92.4 (2.8)***	72.6 (14.6)***
<i>Candida albicans</i>	94.9 (7.1)***	51.6 (23.6)**	100.0 (0.0)***	96.9 (1.4)***	99.5 (1.1)***
<i>Escherichia coli</i>	82.0 (24.3)***	31.1 (31.9)*	19.5 (10.1)*	14.7 (21.2)*	67.0 (23.7)***
Global	73.1 (31.4)***	57.8 (29.4)**	75.8 (31.4)***	65.7 (34.8)**	77.5 (25.6)***
Within 7 days after therapy					
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.8 (10.6)*	8.3 (10.8)*	20.0 (23.0)*	18.7 (19.2)*	12.9 (8.2)*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36.1 (32.3)**	5.1 (14.5)*	32.8 (34.9)*	23.1 (21.5)*	30.1 (21.2)*
<i>Enterococcus faecalis</i>	14.2 (16.5)*	2.8 (7.9)*	22.8 (25.5)*	44.1 (25.2)**	21.2 (21.3)*
<i>Candida albicans</i>	4.5 (4.7)*	3.1 (3.8)*	7.5 (11.9)*	17.9 (8.1)*	28.7 (5.4)*
<i>Escherichia coli</i>	8.0 (19.9)*	6.8 (7.2)*	10.9 (19.4)*	16.4 (14.8)*	5.1 (6.6)*
Global	14.1 (21.0)*	5.2 (9.4)*	18.8 (25.7)*	24.4 (21.4)*	19.6 (17.1)*

Regrowth inhibition: *low ($\leq 33.3\%$); **medium ($33.4\% \leq X \leq 66.6\%$); ***high ($\geq 66.7\%$).

ethanol solution mixed with heparin had lower activity than ethanol alone [47]. In the case of *E. coli*, we also observed that low concentrations of ethanol were not effective in reducing the metabolic activity of biofilm, mainly because of the stimulation of amyloid biogenesis after exposure to ethanol. Lim and colleagues observed that, under low concentrations of ethanol, *E. coli* was able to upregulate the expression of curli and increase extracellular amyloid production, thus strengthening community structure and survival [48]. To our knowledge, no data have been recorded for treatment of *E. faecalis* with ethanol lock solutions, although this micro-organism behaves in the same way as *C. albicans*, where the percentage reduction achieved is greater with higher ethanol concentrations and longer duration of therapy.

Therefore, despite the many concerns that should be taken into consideration, our results are similar to those reported in the literature, where 40% ethanol solutions efficiently killed bacterial and fungal biofilm. However, lock therapies of ≥ 4 h duration must contain an anticoagulant to maintain catheter properties and prevent protein precipitation [49]. Here, we also demonstrated that the combination of 40% ethanol + 60 IU of heparin has considerable antibiofilm properties, thus making

it possible to avoid heparin precipitation and the adverse effects of 70% ethanol.

One of the key points of our study was the battery of regrowth assays using 40% ethanol solutions. The best RI rate was obtained within 24 h after a 72 h therapy of 40% ethanol + 60 IU heparin. However, in this regimen, when RI was measured within seven days after therapy, all micro-organisms regrew and almost 75% of metabolic activity was recovered. Peters *et al.* demonstrated that 30% ethanol and 50% ethanol were needed to completely inhibit regrowth of *S. aureus* and *C. albicans* within 24 h after ethanol therapy [50]. Although their results agree with ours, we also showed that longer periods of regrowth enabled micro-organisms to become metabolically active, because the ability to regrow depends not only on the strain and the concentration of ethanol, but also on the duration of therapy and the time left for regrowth. Based on these results, we hypothesized that the micro-organisms in this study may have undergone a 'viable but non-culturable' (VBNC) cell phenomenon. VBNC cells are metabolically inactive cells that become dormant when exposed to stress and can regrow after a period in nutrient-rich medium and cause persistent and chronic infections [51–53]. Therefore, although we obtained high percentages of reduction in metabolic activity, RI levels were low within seven days after completion of therapy. VBNC cells represent an important issue in public health. Currently there are few methods by which these cells may be detected but they are not implemented in clinical microbiology laboratories [54]. Thus, bacteria can still be virulent enough to produce a chronic infection without being detected. In case of ethanol lock solutions for CRBSI treatment, we have demonstrated that micro-organisms in biofilm can enter the VBNC cell state with all the attendant risks. However, we suggest that 40% ethanol plus heparin applied as lock solution, each 24 h for three days continuously, may control the infection. Besides, although not clinically tested, this solution could be a good choice for the treatment of CRBSI due its low cost and high efficacy. Moreover, currently we are testing this solution in clinical strains from patients suffering from CRBSI.

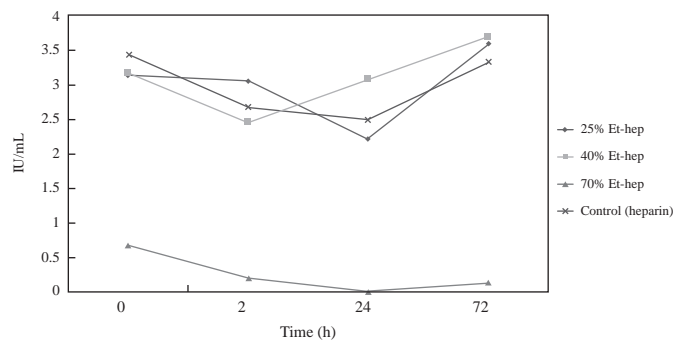


Figure 4. Absorbances of anti-Xa assay for heparin (hep) alone and in combination with 25%, 40%, and 70% ethanol (Et) at 0, 2, 24, and 72 h of incubation.

The present study is the first to show that, in a wide range of micro-organisms and in an exhaustive procedure, 40% ethanol solution combined with 60 IU of heparin for 72 h is promising and would be a good choice for the treatment of CRBSI. However, this should be carefully interpreted as there was a high percentage of regrowth after seven days of finishing the lock therapy. Moreover, our findings are subject to limitations. First, although we used a static 96-well plate model, one of the most popular and successful models for rapid and simultaneous quantification in many samples, this approach is subject to considerable biological variation, even between wells, and no colony-forming unit (cfu) count was performed [55,56]. However, VBNC cells are not detected by cfu counts and therefore this method would have not provided any relevant information to the study. Moreover, 96-well plates are made of polypropylene rather than silicone (catheter material), affecting micro-organism adhesion, biofilm formation, maturation, and architecture. However, it has been demonstrated that biofilm adhesion is increased on polypropylene materials compared with silicone ones [57,58]. Thus, our results showed that even in high-biofilm-forming materials 40% ethanol and heparin was able to achieve $\geq 90\%$ metabolic reduction.

Second, we studied the antibiofilm activity of ethanol and heparin against ATCC strains, except for *S. epidermidis*. However, testing should also have been performed with a large collection of clinical strains to corroborate that ethanol would be at least as good in clinical settings as in ATCC strains.

On the other hand, we only studied the efficacy of ethanol-based lock therapies in monomicrobial biofilms. For that reason, although the incidence of polymicrobial CRBSI episodes is quite low (8.0–17.0%), it would be necessary to assess this efficacy in polymicrobial biofilms due to the clinical relevance that they represent, above all polymicrobial biofilms involving *C. albicans* [59–61].

Although our results are very promising, and a lock solution of 40% ethanol combined with 60–IU of heparin maintained for three days can control the CRBSI to achieve a high percentage of metabolic reduction, further data on this approach are necessary.

In conclusion, our in-vitro study showed that a solution for catheter lock therapy based on 40% ethanol and 60 IU of heparin administered daily for 72 h can almost eradicate the metabolic activity of bacterial and fungal biofilm without heparin being inactivated. However, as RI in this regimen did not reach 25% within seven days of LT, we consider that future studies are needed to evaluate the possible presence of non-metabolically active cells capable of regrowing after the ethanol lock therapy period and how this phenomenon impacts clinical settings.

Acknowledgements

We thank T. O’Boyle for his help in the preparation of the manuscript.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding sources

M. Guembe is supported by the Miguel Servet Program (ISCIII/MICINN, MS13/00268) from the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain.

B. Alonso is supported by the Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0406). The study has been partially financed by the European Regional Development Fund (FEDER) ‘A way of making Europe’ and by grants of ISCIII (PI14/01933).

References

- [1] Riu M, Terradas R, Sala M, Comas M, Knobel H, Grau S, et al. Costs associated with nosocomial bacteraemias in a University Hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:137–42.
- [2] Norris LB, Kablaoui F, Brillhart MK, Bookstaver PB. Systematic review of antimicrobial lock therapy for prevention of central-line-associated bloodstream infections in adult and pediatric cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50:308–17.
- [3] Ferrer C, Almirante B. Infecciones relacionadas con el uso de los catéteres vasculares. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32:115–24.
- [4] Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2014;4:162–7.
- [5] O’Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 2011;52:e162–93.
- [6] Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS* 2017;125:365–75.
- [7] Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(Suppl 1):S1–25.
- [8] Ramasamy M, Lee J. Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. *Biomed Res Int* 2016;2016:1851242.
- [9] Woo SG, Lee SY, Lee SM, Lim KH, Ha EJ, Eom YB. Activity of novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Folia Microbiol (Praha)* 2017;62:157–67.
- [10] Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;49:1–45.
- [11] Suzuki M, Satoh N, Nakamura M, Horita S, Seki G, Moriya K. Bacteremia in hemodialysis patients. *Wld J Nephrol* 2016;5:489–96.
- [12] Raad I, Chaftari AM, Zakhour R, Jordan M, Al Hamal Z, Jiang Y, et al. Successful salvage of central venous catheters in patients with catheter-related or central line-associated bloodstream infections by using a catheter lock solution consisting of minocycline, EDTA, and 25% ethanol. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:3426–32.
- [13] Chaudhury A, Rangineni J, B V. Catheter lock technique: in vitro efficacy of ethanol for eradication of methicillin-resistant staphylococcal biofilm compared with other agents. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65:305–8.
- [14] Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo JM, Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1704–12.
- [15] McGrath E, Du W, Rajpurkar M. Preemptive ethanol lock therapy in pediatric hematology/oncology patients with catheter-associated bloodstream infection: impact on length of stay, cost, and catheter salvage. *Clin Pediatr (Phila)* 2017. 9922817717327.

- [16] Tan M, Lau J, Guglielmo BJ. Ethanol locks in the prevention and treatment of catheter-related bloodstream infections. *Ann Pharmacother* 2014;48:607–15.
- [17] Worth LJ, Slavin MA, Heath S, Szer J, Grigg AP. Ethanol versus heparin locks for the prevention of central venous catheter-associated bloodstream infections: a randomized trial in adult haematology patients with Hickman devices. *J Hosp Infect* 2014;88:48–51.
- [18] Perez-Granda MJ, Barrio JM, Munoz P, Hortal J, Rincon C, Rabadan PM, et al. Ethanol lock therapy (E-Lock) in the prevention of catheter-related bloodstream infections (CR-BSI) after major heart surgery (MHS): a randomized clinical trial. *PLoS One* 2014;9:e91838.
- [19] Broom JK, Krishnasamy R, Hawley CM, Playford EG, Johnson DW. A randomised controlled trial of Heparin versus Ethanol Lock Therapy for the prevention of Catheter Associated infection in Haemodialysis patients – the HEALTHY-CATH trial. *BMC Nephrol* 2012;13:146.
- [20] Colvine J, Thomson P, Duerksen DR. Management of recurrent catheter-related bloodstream infections in an adult patient receiving home parenteral nutrition: dramatic effect of ethanol lock therapy. *J Parenter Enteral Nutr* 2017;41:1072–4.
- [21] Pittiruti M, Bertoglio S, Scoppettuolo G, Biffi R, Lamperti M, Dal Molin A, et al. Evidence-based criteria for the choice and the clinical use of the most appropriate lock solutions for central venous catheters (excluding dialysis catheters): a GAVeCeLT consensus. *J Vasc Access* 2016;17:453–64.
- [22] Vassallo M, Dunais B, Roger PM. Antimicrobial lock therapy in central-line associated bloodstream infections: a systematic review. *Infection* 2015;43:389–98.
- [23] Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008;72:157–65.
- [24] Arzmi MH, Alnuaimi AD, Dashper S, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M. Polymicrobial biofilm formation by *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain and medium dependent. *Med Mycol* 2016;54:856–64.
- [25] Serrano-Fujarte I, Lopez-Romero E, Reyna-Lopez GE, Martinez-Gamez MA, Vega-Gonzalez A, Cuellar-Cruz M. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. *Biomed Res Int* 2015;2015:783639.
- [26] Han R, Klu YAK, Chen J. Attachment and biofilm formation by selected strains of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of fresh produce origin. *J Food Sci* 2017;82:1461–6.
- [27] Arzmi MH, Dashper S, Catmull D, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M. Co-aggregation of *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain dependent. *FEMS Yeast Res* 2015;15(5):fov038.
- [28] Restrepo D, Laconi NS, Alcantar NA, West LA, Buttice AL, Patel S, et al. Inhibition of heparin precipitation, bacterial growth, and fungal growth with a combined isopropanol-ethanol locking solution for vascular access devices. *J Pediatr Surg* 2015;50:472–7.
- [29] Cullis PS, Keene DJ, Zaman A, Barker C, Govan L, Minford J. Chemical stability of heparin, isopropanol, and ethanol line lock solutions. *J Pediatr Surg* 2015;50:315–9.
- [30] Rosenblatt J, Reitzel R, Dvorak T, Jiang Y, Hachem RY, Raad II. Glycerol trinitrate complements citrate and ethanol in a novel antimicrobial catheter lock solution to eradicate biofilm organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3555–60.
- [31] Bell T, O'Grady NP. Prevention of central line-associated bloodstream infections. *Infect Dis Clin North Am* 2017;31:551–9.
- [32] Rupp ME, Majorant D. Prevention of vascular catheter-related bloodstream infections. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:853–68.
- [33] Maiefski M, Rupp ME, Hermsen ED. Ethanol lock technique: review of the literature. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:1096–108.
- [34] McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147–79.
- [35] Mermel LA, Alang N. Adverse effects associated with ethanol catheter lock solutions: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2611–9.
- [36] Sofroniadou S, Revela I, Kouloubinis A, Makriniotou I, Zerbala S, Smirloglou D, et al. Ethanol combined with heparin as a locking solution for the prevention of catheter related blood stream infections in hemodialysis patients: a prospective randomized study. *Hemodial Int* 2017;21:498–506.
- [37] Blackwood RA, Issa M, Klein K, Mody R, Willers M, Teitelbaum D. Ethanol lock therapy for the treatment of intravenous catheter infections that have failed standard treatment. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2017;6:94–7.
- [38] Valentine KM. Ethanol lock therapy for catheter-associated blood stream infections in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2011;12:e292–6.
- [39] Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist* 2014;7:343–63.
- [40] Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. In vitro approach for identification of the most effective agents for antimicrobial lock therapy in the treatment of intravascular catheter-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2923–31.
- [41] Qu Y, Istivan TS, Daley AJ, Rouch DA, Deighton MA. Comparison of various antimicrobial agents as catheter lock solutions: preference for ethanol in eradication of coagulase-negative staphylococcal biofilms. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 4):442–50.
- [42] Cincarova L, Polansky O, Babak V, Kulich P, Kralik P. Changes in the expression of biofilm-associated surface proteins in *Staphylococcus aureus* food-environmental isolates subjected to sub-lethal concentrations of disinfectants. *Biomed Res Int* 2016;2016:4034517.
- [43] Luther MK, Bilida S, Mermel LA, LaPlante KL. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Dis Ther* 2015;4:219–26.
- [44] Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:740–55.
- [45] Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol* 2017;307:481–9.
- [46] Korem M, Gov Y, Rosenberg M. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb Pathog* 2010;48:74–84.
- [47] Shanks RMQ, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL, et al. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun* 2005;73:4596–606.
- [48] Lim JY, May JM, Cegelski L. Dimethyl sulfoxide and ethanol elicit increased amyloid biogenesis and amyloid-integrated biofilm formation in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:3369–78.
- [49] Liu J, Wang Ca, Zhao H, Zhang J, Ma J, Hou Y, et al. Anticoagulant therapies versus heparin for the prevention of hemodialysis catheter-related complications: systematic review and meta-analysis of prospective randomized controlled trials. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:11985–95.
- [50] Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:74–82.

- [51] Ding T, Suo Y, Xiang Q, Zhao X, Chen S, Ye X, et al. Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: induction, detection, and control. *J Microbiol Biotechnol* 2017;27:417–28.
- [52] Orruno M, Kaberdin VR, Arana I. Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *Wld J Microbiol Biotechnol* 2017;33:45.
- [53] E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Genet Mol Res* 2015;14:14790–801.
- [54] Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front Publ Hlth* 2014;2:103.
- [55] Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2010;83:89–105.
- [56] Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens* 2013;2:288–356.
- [57] Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect Institut Pasteur* 2009;11:753–61.
- [58] da Silva Meira QG, de Medeiros Barbosa I, Alves Aguiar Athayde AJ, de Siqueira-Júnior JP, de Souza EL. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 2012;25:469–75.
- [59] Nielsen XC, Chen M, Hellesøe A-MB, Jeppesen PB, Gyldenlykke J, Tvede M, et al. Etiology and epidemiology of catheter related bloodstream infections in patients receiving home parenteral nutrition in a gastromedical center at a tertiary hospital in Denmark. *Open Microbiol J* 2012;6:98–101.
- [60] Strasheim W, Kock MM, Ueckermann V, Hoosien E, Dreyer AW, Ehlers MM. Surveillance of catheter-related infections: the supplementary role of the microbiology laboratory. *BMC Infect Dis* 2015;15:5.
- [61] Shirliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2009;299:1–8.