



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
CURSO DE ESPECIALIDAD EN INFECTOLOGÍA**

**ALTA PRODUCCIÓN DE BIOFILM EN CEPAS DE
ACINETOBACTER BAUMANNII MULTI-DROGO
RESISTENTE COMO FACTOR PREDICTOR DE
MORTALIDAD Y PERSISTENCIA EN CULTIVOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA**

PRESENTA:

DR. PÁMELA GARCIADIEGO FOSSAS

**DRA. ANA PATRICIA RODRIGUEZ ZULUETA
DIRECTOR DE TESIS**



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Formación de biofilm.....	5
Fenotipos relacionados con biofilm.....	7
Papel de biofilm en infecciones crónicas.....	11
Métodos de medición de biofilm.....	11
Tratamiento.....	13
Futuras direcciones en la investigación de biofilm.....	13
Justificación.....	15
Pregunta de investigación.....	15
Objetivos.....	15
Hipótesis.....	15
Material y métodos.....	16
Resultados.....	18
Discusión.....	25
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30

RESUMEN

Introducción: *Acinetobacter baumannii* ha surgido en años recientes como una causa mayor de infecciones nosocomiales con altas tasas de morbi-mortalidad. La adquisición nosocomial de cepas multi-drogo resistentes de *A. baumannii* sigue siendo un problema debido a la gran habilidad de este patógeno de diseminarse y colonizar a los pacientes y reservorios del medio ambiente. Se ha planteado que esta habilidad para persistir en estos ambientes, así como su virulencia, resulta de su capacidad de generar biofilm. El objetivo de este estudio es valorar producción de biofilm en cepas de *A. baumannii multidrogo-resistente (MDR)* como factor de mortalidad y persistencia en cultivos.

Material y métodos: Se analizó la producción de biofilm en cepas de *A. baumannii MDR* de pacientes hospitalizados en el Hospital Gea González. Se clasificó como alta producción (valores $>60\%$) vs baja producción ($<60\%$). Se obtuvieron datos demográficos, microbiológicos y clínicos de los pacientes infectados por medio del expediente clínico. Se compararon las cepas de alta y baja producción de biofilm por medio de la prueba exacta de Fisher y Chi cuadrada, se tomó como valor estadísticamente significativo $p < 0.05$

Resultados: Se analizaron 38 cepas de *A. baumannii MDR* de 26 pacientes; 7 (18%) fueron altas productoras de biofilm. Diez pacientes fallecieron (38%), 6 de ellos por neumonía asociada a ventilador. Los pacientes infectados por cepas con alta producción de biofilm presentaron mayor mortalidad y mayor persistencia en cultivo.

Conclusiones: La mayoría de las cepas de *A. baumannii* son capaces de formar biofilm *in vitro*. Los resultados presentes sugieren una asociación entre la alta producción de biofilm y persistencia de cultivo bronquial así como con mortalidad. El número pequeño de casos no permitió realizar un análisis multivariado tomando en cuenta otros posibles factores confusores. Se requieren nuevos estudios para corroborar estos hallazgos y para explorar el uso de tubos endotraqueales cubiertos de plata u otros materiales como mediada para disminuir la prevalencia de cepas de alta producción de biofilm.

ABSTRACT

Background: *Acinetobacter baumannii* is a Gram- negative significant worldwide nosocomial pathogen. This microorganism survives in hospital environments despite unfavorable conditions. It is hypothesized that its ability to persist in these environments, as well as its virulence, is a result of its capacity to form biofilms. The aim of this study was to evaluate if the biofilm production in strains of *A. baumannii* multidrug resistant (MDR)- is an independent factor for persistence in culture and mortality.

Methods: We analyzed the biofilm production of *A. baumannii* MDR isolates from patients admitted in Hospital Gea Gonzalez. Isolates with > 60% values of biofilm production were defined as high biofilm production, <60% were defined as low biofilm production. Patients , demographic, clinical and microbiologic data was retrospectively analyzed using clinical charts. We compared high biofilm production isolates vs non high biofilm production isolates. Chi square and Fisher exact test were used as appropriate , a *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Results. Thirty eight strains of *A. baumannii MDR* were isolated from twenty six patients.;7 isolates (18%) were high biofilm producers *in vitro*. Ten patients died (38%); 6 related to *A. baumannii* ventilator associated pneumonia. There was a statistically significance in the relationship between biofilm production and persistence in culture, as well as mortality.

Conclusions: Some clinical isolates of *A. baumannii* are able to form biofilms *in vitro*. We examined isolates to see whether the biofilm production could be linked in some way to mortality and persistence culture. The present results suggest an association between high biofilm production and persistence bronchial culture and with mortality. The small number of cases did not allow making a multivariate analysis to take into account the several possible confounding factors. Further studies are needed to explore the possibility of silver coated endotracheal tubes as a measure for decreases the prevalence of isolates with high producers biofilm strain.

INTRODUCCION

Acinetobacter baumannii es una bacteria cocobacilo Gram negativa, la cual se ha descrito como parte de la flora normal del ser humano en piel, garganta y recto. Ha surgido en años recientes como una causa mayor de infecciones nosocomiales con altas tasas de morbi-mortalidad. (1)

A pesar de grandes esfuerzos, la adquisición nosocomial de cepas multi-drogo resistentes de *A. baumannii* sigue siendo un problema debido a la gran habilidad de este patógeno de diseminarse, colonizar a los pacientes y reservorios del medio ambiente. (2, 3) Sobrevive a pesar de condiciones no favorables como desecación, depleción de nutrientes y tratamiento antibiótico. Se ha planteado que esta habilidad para persistir en estos ambientes, así como su virulencia, resulta de su capacidad de generar biofilm. (4,5)

El biofilm o biopelícula esta compuesto por una comunidad de células bacterianas múltiples asociadas con superficies, ya sean bióticas o abióticas, arregladas en estructuras terciarias en intimo contacto unas con otras, embebidas en una matriz extracelular que contienen diferentes tipos de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) incluyendo proteínas, DNA y polisacáridos. (6) En general el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total.

La primera descripción en el campo de medicina sobre biofilms fue en 1961 Rogovska et al. (7) En 1977 Hoiby describió agregados de *Pseudomonas aeruginosa* en los pulmones de pacientes con fibrosis quística infectados crónicamente. (8) En 1978, Costerton et al.(9) describió la presencia de bacterias adheridas en la superficie embebidas a un “glicocalix” (matriz), y en 1981 se uso el término de biofilm por primera vez para describir este fenómeno. (10) El fenómeno fue revisado y re-descrito en 1987 por Costeron et al, como un modo de crecimiento dentro de una matriz. (11)

Formación de biofilm

El proceso de desarrollo de biofilm se ha estudiado ampliamente usando sistemas de superficies *in vitro*. La bacteria más común estudiada es *Pseudomonas aueruginosa*..

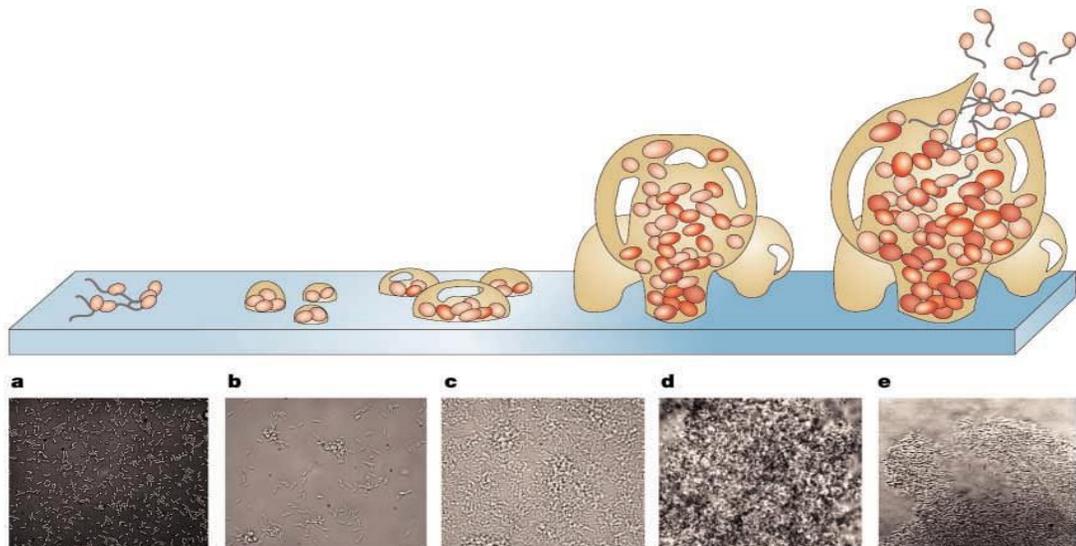
La habilidad de *P. aeruginosa* de formar biofilm se cree que es una de sus múltiples estrategias para sobrevivir, y se considera un factor importante de patogenicidad.

Existen diferentes etapas en la formación de biofilm bacteriano, son (12) (Ver figura 1):

- (1) Unión reversible de células individuales a la superficie
- (2) Progresión a unión irreversible mediado por polisacáridos extracelulares
- (3) Desarrollo temprano de la arquitectura del biofilm
- (4) Maduración de la arquitectura del biofilm
- (5) Dispersión de células únicas desde el biofilm

La superficie es cubierta de bacterias móviles.

Figura 1. Etapas en la formación de biofilm. (Fotomicrografías de *Pseudomonas aeruginosa*) –(13)



De forma ocasional se ha planteado que la formación de biofilm, desde una célula fenotípicamente planctónica a crecimiento sésil es un proceso complejo y altamente regulado. Se ha sugerido que depende de la expresión de un programa específico. (14, 15) Sin embargo, todas las observaciones *in vitro* disponibles sugieren que es más probable

que la formación de biofilm sea precedida de una serie de eventos temporales que reflejan adaptación a condiciones de nutrición y de medio ambiente, (16-18) indicando que la formación de biofilm, y el crecimiento y desarrollo exitoso, es un proceso complejo pero arbitrario.

Se ha propuesto que todos los biofilms bacterianos tienen un número de componentes funcionales conservados en común; incluyendo homólogos de adhesión a superficies secundarios a Bap (Biofilm Associated Protein), identificada de forma inicial en *S. aureus*. Los miembros de la familia Bap se definen como proteínas de alto peso molecular que están presentes en las superficies bacterianas, y confieren a la bacteria la habilidad de formar biofilm. La Bap de *A. baumannii* no parece estar involucrada en la unión primaria de células a superficies, lo cual la hace diferente a la Bap de *S. aureus* (19); Al parecer la Bap de *A. baumannii* parece estar involucrada en el mantenimiento de la arquitectura del biofilm maduro -etapas 3 y 4. (20)

La presencia y expresión del gen bla PER-1 y su habilidad para resistir al suero humano también son factores que juegan un papel positivo en la formación de biofilm en cepas de *A. baumannii*. (21) Se ha observado que la adhesividad celular y la formación de biofilm en plástico es mayor en cepas que expresan el gen blaPER-1. (22)

Otra proteína de membrana que se ha implicado en la formación de biofilm es OmpA; al parecer no es esencial en el desarrollo de biofilm, pero se requiere para la formación de biofilm grueso en poliestireno. (23)

Fenotipos relacionados con el biofilm

A) Susceptibilidad antimicrobiana disminuida

Una de las características más importantes de los biofilms bacterianos es una disminución en la susceptibilidad a agentes antimicrobianos. (24-26) Esta disminución tienen dos aspectos: tolerancia y resistencia. Tolerancia se refiere a que la bacteria no muere pero es incapaz de crecer en presencia del fármaco, mientras que resistencia permite a la bacteria crecer en presencia de antibióticos.

La tolerancia es causada por los siguientes factores:

1.- arquitectura tri-dimensional (ej. presencia de varias capas de bacterias que promueven el desarrollo de nutrientes y gradientes de oxígeno y disminuyen el crecimiento en el centro del agregado. (27)

2.- Los componentes de la matriz pueden unir y/o neutralizar a los agentes antimicrobianos. (28)

Uno de los factores que más se ha atribuido como un papel en la resistencia antibiótica a los biofilms es su inhabilidad de penetrar a todas las áreas del mismo. Existen varios estudios sobre penetración de antibióticos al biofilm evaluado con medición en la concentración del antibiótico en la base del biofilm, los cuales establecen que el biofilm puede ser penetrado por antibióticos, pero de forma reducida, y depende del tipo de antibiótico usado, sin ser correlacionado de forma directa con la susceptibilidad. (29)

La población en biofilms se encuentran de forma típica a altas densidades celulares comparado con las bacterias planctónicas. Se ha planteado que la elevada densidad celular en la población de biofilm puede contribuir, en parte, a la resistencia al tratamiento antimicrobiano. Larsen et al. (30) ha reportado que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de antibióticos como amoxicilina, doxiciclina y metronidazol aumentó al probarlo con poblaciones plantónicas de *Porphyromonas gingivalis* con densidades celulares similares a las encontradas en poblaciones de biofilm (10×10^8 a la $7-8 \times 10^8$ cel mL⁻¹). Este resultado indica que el efecto inoculo es parte de la explicación en la resistencia de bacterias en biofilm.

Se han demostrado diferentes crecimientos dentro de los agregados del biofilm. El grupo de Soren Molin en la Universidad Técnica Danesa ha sido uno de los líderes en el estudio de actividad metabólica dentro de los biofilms; y han demostrado al usar marcadores metabólicos específicos fluorescentes que las células en el centro de las grandes microcolonias del biofilm tienen tasas metabólicas reducidas comparadas a las células cercanas o en la superficie. (31)

DeBeer et al. (32) han medido de forma directa la concentración de oxígeno a varias profundidades del biofilm usando microelectrodos; demostrando que en el centro de las microcolonias es casi 30 veces menor, Éstas investigaciones demuestran la presencia de áreas dentro del biofilm que están habitadas por fases estacionarias o inclusive bacterias dormidas/inactivas. Esto minimiza el efecto de muchos antibióticos ya que sus sitios de acción dependen del proceso de crecimiento activa.

Antibióticos con actividad contra células no en crecimiento han demostrado tener mayor actividad contra bacterias dentro de biofilms comparados con antibióticos que dependen del crecimiento rápido para su actividad. Imipenem y ciprofloxacina cuando se usan en *E. coli* en crecimiento en biofilm, su actividad fue mayor comparada con antibióticos como beta lactámicos que son solo efectivos contra bacterias en crecimiento; pero menos efectivas que éstos al usarse contra *E. coli* plantónico.(33-35)

Independientemente del crecimiento bacteriano, los microambientes en el biofilm causados por diferencias en el pH, pCO₂ o pO₂ podrían también afectar la eficacia de los compuestos antimicrobianos. (por ej la actividad de macrolidos y tetraciclinas está comprometida a bajos pH mientras que los aminoglucósidos dependen de la disponibilidad de oxígeno) (27)

El DNA extracelular en la matriz se ha reportado que neutraliza la actividad de los antimicrobianos como la tobramicina mediante su capacidad de quelar de cationes. (28)

B) Tolerancia fagocítica

Para que una bacteria persista en un ambiente hostil, como una infección, se necesita protección de fagocitosis. Durante una infección, la primera respuesta a una bacteria invasiva es vía los componentes celulares de la defensa del huésped innata, especialmente los polimorfonucleares. (36) Las bacterias planctónicas son fácilmente controladas por éstos fagocitos, mientras que el biofilm maduro parece

proteger. Esta protección parece ser muy importante en infecciones crónicas ya que todos los reportes muestran que la presencia de biofilms bacterianos promueven el reclutamiento de polimorfonucleares, sin embargo ocurre un fenómeno que se le ha reconocido como “ fagocitosis frustrada”. (37) Este mecanismo pareciera ser tipo químico, ya que la bacteria en el biofilm puede producir compuestos que deshabilitan o inclusive matan a células como los polimorfonucleares. La producción de ramnolípido por *P. aeruginosa* en biofilms es un ejemplo de esto tanto in vitro como en animales. (38)

- C) Quorum sensing: un rasgo dependiente de la densidad es la comunicación célula a célula conocida como quórum sensing (QS), en el cual “quórum” se refiere al mínimo número de bacterias agregados dentro de un volumen específico que se requiere para llevar a cabo una “decisión” para cambiar la expresión genética de genes controladores del QS. (39)

Este mecanismo esta conectado con altas densidades celulares, que se encuentran en los biofilms, aunque no de forma exclusiva. Las células no están enteradas fisiológicamente de la presencia de densidad de otras bacterias, pero pueden persistir la concentración de moléculas de señalización que indican densidad celular. Por lo tanto, las bacterias censan moléculas de señalización que son proporcionales a la densidad celular. Este principio es común tanto en bacterias gram positivas como gram negativas, aunque los mecanismos moleculares y de señalización son diferentes. Particularmente, la regulación de la producción de ramnolípido por *P. aeruginosa* se sabe que esta regulada por el QS. (40)

La tolerancia antibiótica también pareciera estar regulada por el QS, al menos en parte, aunque el mecanismo completo no se conoce completamente. QS regula la liberación de DNA extracelular, el cual es un quelante de aminoglucósidos. (41)

Papel del los biofilm en infecciones crónicas

Las infecciones crónicas tienen una progresión más lenta comparada con las infecciones agudas y sus síntomas por lo general son vagos. Son difíciles, en ocasiones imposible, de curar con antibióticos.

Los biofilms típicamente se encuentran involucrados en infecciones crónicas persistentes. Numerosos estudios in vitro e in vivo demuestran que la causa de la mayoría de las infecciones persistentes son agregados bacteriano o biofilms. (42)

Infecciones bacterianas crónicas relacionadas con formación de biofilm incluyen: osteomielitis, heridas crónicas, rinosinusitis, otitis media crónica, infecciones de tracto urinario, tuberculosis, infecciones asociadas a inserción de cuerpos extraños como neumonías asociadas a ventilador. (43-47)

Métodos de medición de formación de biofilm

Existen varios métodos para la detección de la producción de biofilm. (48) A continuación se describen los métodos fenotípicos más comúnmente usados.

1. Método de placa de cultivo de tejidos: Descrito por Christensen et al. (49), se considera el estándar de oro para la detección de biofilm. Los organismos aislados de placas de agar se inoculan en 10 mL de medio de caldo de soya trupticosa con 1% de glucosa, se incuba a 37° C por 24 hrs. Posteriormente el cultivo se diluye 1:100 con medio fresco. 96 Pozos individuales estériles con fondo plano se llenan con 200µL de la dilución de los cultivos. Los controles también se incuban y se agregan a los pozos. Los pozos se incuban a 37 grados por 24 hrs. Posterior a incubación, el contenido de cada pozo se remueve de forma gentil, se lava con solución salina fosfato 0.2mL 4 veces, esto remueve las bacterias flotando. El biofilm formado por las bacterias se adhiere a los posos se fija con acetato sódico al 2% y tinción cristal violeta (0.1%). Exceso de tinción se remueve con agua desoxigenada y se deja secar los pozos. Pos densitometría óptica se mide adherencia de biofilm con una longitud de onda 570 nm. El experimento se realiza por triplicado La interpretación se realiza por medio de los criterios de Stepanovic et al. (50)

Tabla1. Interpretación en la producción de biofilm

Promedio valor en DO*	Producción de biofilm
≤ 2 x DO control	Producción nula o debil
2x DO control a ≤ 4 x DO control	Producción moderada
> 4 x DO control	Alta producción

*DO Densidad óptica.

2. Método Agar Rojo Congo: Descrito por Freeman et al. (51) , método cualitativo para detección de producción de biofilm usando medio Agar Rojo Congo, el cual se prepara con infusión corazón cerebro 37g/L, sucrosa 50g/L agar No 1 10g/L e indicador rojo Congo 8g/L. Se incuba el organismo a 37° C por 24 hrs de forma aeróbica. Colonias negras con una consistencia cristalina seca indican producción de biofilm. Se realiza en triplicado.

3. Método de tubo: Descrito por Christensen et al. (52) Método cualitativo en la detección de biofilm. Se incuba el microorganismo estudiado en 10 mL de medio de caldo de soya trupticasa con 1% de glucosa en tubos. Se incuba a 37°C por 24 hrs. Posterior a incubación, los tubos se decantas y lavan con sol salina buffer fosfato (pH7.3) y se seca. Se tiñen los tubos con cristal violeta (0.1%) El exceso de tinción se lava con agua desionizada, Se secan los tubos y se invierte su posición. Se considera formación de biofilm positivo cuando se visualiza una película en la pared en el fondo del tubo. La cantidad de biofilm formada se mide como 1- débil/ninguna, 2-moderada y 3- alta/fuerte. El experimento se realiza en triplicado.

Otros métodos para la medición de biofilm: ensayo bioluminiscente, sensor piezoeléctrico, examinación fluorescente microscópica. Algunos estudios han reportado una relación entre la formación de biofilm reportada por la prueba en placas de microtitulación o de 96 pozos y la realizada por microscopía epifluorescente, sugiriendo que el primero puede ser usado como un método simple en la evaluación de formación de

biofilm .

En un estudio realizado por Afreenish Hassan et al en Pakistan (48) donde se comparan los diferentes métodos fenotípicos de medición de biofilm en 110 aislamientos de *S epidermidis*, *E coli*, *K pneumoniae*, *S aureus*, *E faecalis* y *P aeruginosa*. Se concluye que el mejor método es el de 96 pozos, seguido por el método de tubo con una sensibilidad del 73% y especificidad del 92% (VPP 94% VPN 66%) y por último el Método de Agar Rojo Congo, con una sensibilidad de solo 11% especificidad del 92% (VPP 73% VPN 37%)

Tratamiento

Las infecciones con biofilm no pueden ser tratadas de la misma manera que las infecciones agudas. El tratamiento más eficiente para este tipo de infecciones es remover el área infectada o parte del cuerpo.

Las dos estrategias para prevenir o suprimir las infecciones bacterianas con biofilm son: (A) tratamiento antibiótico agresivo temprano antes de que el biofilm se forme , (B) tratamiento antibiótico supresivo crónico una vez que el biofilm esta establecido. Si no puede ser removido físicamente; la administración de antibióticos para tratar los biofilms demandan la combinación de diferentes tipos de antibióticos (diferentes mecanismos de acción, subpoblaciones y penetración) en altas dosis y por un período de tiempo extendido ya que los mecanismos de resistencia convencionales contribuirán a los mecanismos de resistencia intrínsecos en el biofilm. (53)

Futuras direcciones en la investigación de biofilm

Una de las grandes dificultades en el tratamiento de infecciones que producen biofilm se genera de la falta de entendimiento de las características de crecimiento del biofilm. Hasta ahora, no se han realizado investigaciones que examinen las características fenotípicas de todo el ciclo de crecimiento en patógenos bacterianos formadores de biofilm. Entender como y cuando tratar infecciones en biofilm requiere el conocimiento de si la población bacteriana es de un solo fenotipo o de varios. Si se demuestra que existen fenotipos separados, el tratamiento antibiótico puede no ser efectivo contra la

infección entera, dejando atrás células que recolonizan y debilitan al huésped. La presencia de éstas subpoblaciones celulares ha sido descrita por Lewis y sus colaboradores los cuales refieren a esta bacteria resistente como “ células persistentes”. (54, 55) Se han sugerido un sin numero de explicaciones sobre la marcada resistencia en estas células persistentes, incluyendo mutaciones o alteraciones en la maquinaria celular responsable de la muerte celular programada o apoptosis. (56)

El futuro de estrategias en el tratamiento de infecciones en biofilm parece descansar combatir puntos específicos únicos en las características del biofilm, ya sea en combinación con antibióticos convencionales o regímenes ajustados de tratamiento para erradicar biofilm en infecciones cuando son más susceptibles a antibióticos.

JUSTIFICACION

- El *A. baumannii* es una bacteria que en los últimos años se ha reportado como una de las más importantes en el ámbito intrahospitalario asociada a brotes, con una tasa de resistencia elevada y con respuesta variable al tratamiento.
- En el hospital General Gea González existe una tasa elevada de infecciones nosocomiales secundarias a *A. baumannii*.
- La producción de biofilm por algunas bacterias se ha asociado con una respuesta menor a tratamiento, con mayores tasas de recidiva y de morbi-mortalidad.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La cantidad de producción de biofilm por *A. baumannii MDR* es un factor que puede determinar la persistencia de dicho microorganismo en pacientes infectados y desencadenar mayor mortalidad?

OBJETIVOS

Primario

Cuantificar la producción de biofilm en cepas de *A. baumannii* Multidrogo-resistentes y correlacionarla con la mortalidad

Secundario

Evaluar si la alta producción de biofilm se asocia a persistencia en cultivo

HIPÓTESIS

La producción elevada de biofilm en cepas de *A. baumannii MDR* es un factor asociado a mayor mortalidad y persistencia en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

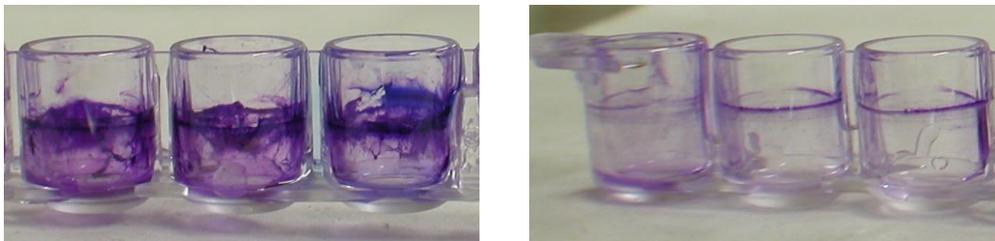
Estudio descriptivo, observacional, transversal, homodérmico, unicéntrico retrospectivo.

Se trata de un estudio retrospectivo realizado en el Hospital General Dr Manuel Gea Gonzalez donde se analizaron todas las cepas de *Acinetobacter baumannii* multidrogo-resistente; definido como resistencia a aminoglucósidos, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, en un período de enero del 2011 a septiembre del 2011. La identificación y susceptibilidad se realizó por medio del sistema automatizado MicroScan Walkaway®.

Se evaluó la producción de biofilm por medio de un ensayo en microplaca de 96 pozos el cual se realizó de la siguiente manera:

Del cultivo inicial se realizó una dilución de 1:100 en el medio BHI_TT y se tomaron 100µl, se transfirieron por triplicado a una microplaca de polivinil de 96 pozos de fondo en “U”. Se incubaron a 37 ° durante 48 horas, una vez transcurrido este tiempo se removieron las células planctónicas mediante decantación y se realizaron tres lavados sumergiendo la microplaca en agua destilada estéril. Después se removió el excedente de colorante mediante dos lavados. A la microplaca se le agregó 200µl de etanol al 95% durante 15min a temperatura ambiente. Finalmente se transfirió 125µl de etanol y el biofilm teñido a otra microplaca estéril de fondo plano en donde se efectuó la lectura en espectrofotómetro a una densidad óptica de 630nm de absorbancia, con la finalidad de evidenciar la formación de biofilm. Se incluyó como cepas control la *E. coli DH5 alfa* como productor débil y la *P. aeruginosa 27853* como productor fuerte.

Figura 2. Controles: positivo *Pseudomonas aeruginosa 27853* (izquierda); negativo *Escherichia coli DH5 alfa*.



De acuerdo a la cantidad de producción de biofilm se clasifico como alta producción de biofilm niveles iguales o mayores al 60%, y baja producción de biofilm niveles menores al 60%.

Se obtuvieron datos demográficos, clínicos y microbiológicos de los pacientes infectados de forma retrospectiva por medio del expediente clínico.

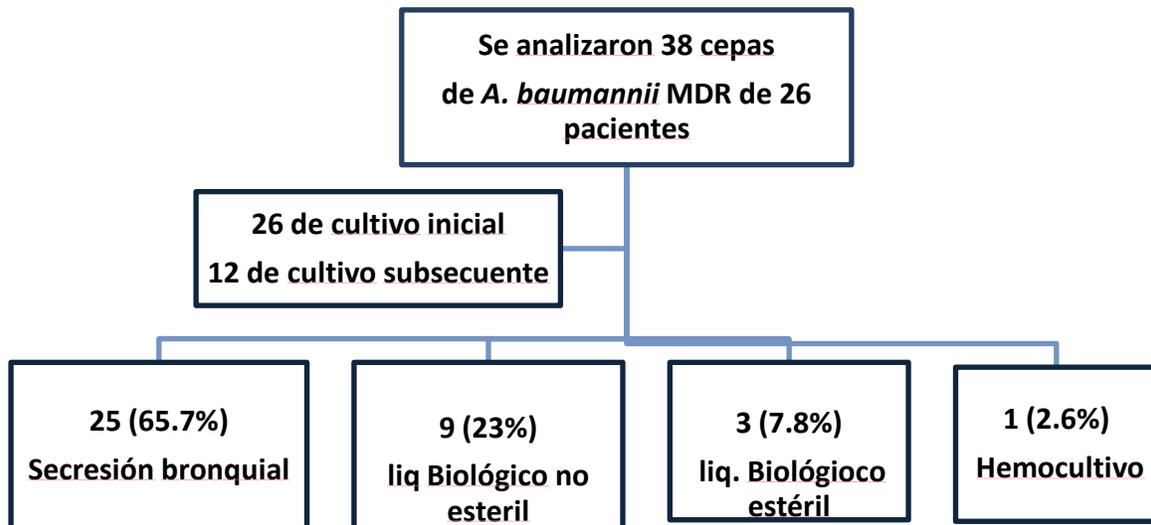
Las variables analizadas fueron las siguientes: sexo, edad, peso, talla, índice de masa corporal, insuficiencia hepática, enfermedad autoinmune, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus, inmunosupresión, ingreso hospitalario previo, fecha de ingreso y egreso, días de estancia intrahospitalaria, días de estancia previo a infección por *A. baumannii*, diagnóstico de ingreso, admisión a terapia intensiva, días de estancia en terapia intensiva, uso de aminas vasopresoras, días de uso de aminas vasopresoras, ventilación mecánica invasiva, días de ventilación mecánica invasiva, traqueostomía, intervención quirúrgica, diálisis peritoneal o hemodiálisis, signos vitales al ingreso y al momento de la infección, laboratorios generales al ingreso y al momento de la infección, presencia de falla orgánica múltiple o insuficiencia renal aguda, fecha de cultivo, origen de cultivo, otros aislamientos, nuevos cultivos positivos, uso de antibióticos previos, tratamiento posterior a cultivos, muerte.

Se efectuó un análisis descriptivo y bivariado de la información. Se comparó a los pacientes infectados de cepas con alta producción de biofilm vs pacientes infectados con cepas de baja producción. Para variables cualitativas se utilizó Chi cuadrada o prueba exacta de Fisher, según fuera el caso. Para variables cuantitativas se utilizó T student o Mann Whitney, de acuerdo a la distribución de las variables. Se tomo como valor estadísticamente significativo una p menor a 0.05 .

RESULTADOS

Se analizaron 38 cepas de *A. baumannii* MDR de 26 pacientes hospitalizados; 26 de cultivo inicial y 12 de cultivo subsecuente (tabla 2 y 3). Fueron analizadas por medio del equipo automatizado MicosScan Walkaway®. Todas las cepas presentaron formación de biofilm, con una media de 0.167 OD (min 0.044 - máx 0.459); se dividieron las cepas de acuerdo a la capacidad de producción comparada con el control positivo y negativo, se definió como alta producción de biofilm aquellas cepas con formación de 60% o más y baja producción aquellas con menos del 60% de formación de biofilm; 7 cepas (18%) fueron altos productores de biofilm *in vitro*. Los sitios de aislamiento fueron: secreción bronquial (25), hemocultivos (1), líquidos biológicos estériles (3); dos de ellos de cavidad abdominal y uno de líquido sinovial, líquidos biológicos no estériles (9). (Figura 3). Dos pacientes presentaron diferentes sitios de aislamiento; uno de ellos de secreción bronquial y hemocultivo; el segundo de secreción bronquial y líquido biológico no estéril.

Figura 3. Cepas analizadas y su distribución en cuanto a sitio de aislamiento.



El 100% de las cepas aisladas con alta producción de biofilm se obtuvieron de cultivo de secreción bronquial, presentado diferencias estadísticamente significativas, comparado con un 42% aisladas del mismo sitio en pacientes infectados por cepas de baja producción.

Se obtuvieron datos epidemiológicos, clínicos y microbiológicos de forma retrospectiva a través del expediente clínico, 1 de los pacientes no fue posible analizar el expediente; el análisis univariado se muestra en la tabla 1. 50% de ellos eran hombres, con una edad media de 45 años, 1 con insuficiencia hepática CHILD A, 4/25 (16%) con Diabetes Mellitus tipo 2, 1 (4%) con inmunosupresión por VIH, 2 con cardiopatía (8%), 4 con otros padecimientos crónicos. 5/25 pacientes (20%) tenían admisión hospitalaria previa en el último año.

La media de días de estancia intrahospitalaria fue de 31.88; siendo mayor en pacientes infectados por cepas de alta producción de biofilm ($p = 0.013$), sin embargo al evaluar los días de estancia desde el inicio de la infección no se mostraron diferencias significativas (20 vs 14 $p=0.396$).

Catorce pacientes (53%) estuvieron internados en algún momento en el servicio de terapia intensiva, de los cuales 6 eran pacientes con infección por cepas de alta producción y 8 de cepas de baja producción. 12 de ellos se infectaron durante su estancia en terapia, los 2 que se infectaron fuera de la estancia eran pacientes con baja producción de biofilm. Los pacientes con infección por cepas de alta producción de biofilm presentaron más días en este servicio comparado con los pacientes con *Acinetobacter* de baja producción de biofilm ($p = .001$);

El 80% de los pacientes recibieron ventilación mecánica invasiva; de los cuales 7/7(100%) eran los infectados por cepas de alta producción y 13/19(47%) eran pacientes infectados por cepas de baja producción, sin diferencias estadísticamente significativas; sin embargo los pacientes con cepas de *Acinetobacter* con alta producción estuvieron más días bajo ventilación mecánica invasiva (35 vs 9, $p=0.011$). A 10 pacientes se les realizó

traqueostomía (40%); 4 pacientes con infección por cepas de alta producción , sin diferencias significativas.

Todos los pacientes con infección por cepas altamente productoras de biofilm recibieron aminas vasopresoras con diferencias estadísticamente significativa al compararlo con los pacientes de baja producción. ($p= 0.01$), con una media de 14 días vs 3.7 días ($p= 0.008$).

El 80% de los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente, sin presentar diferencias comparando el grupo de pacientes infectados por alta vs baja producción de biofilm.

24/25 pacientes (96%) recibieron 3 o más antibióticos previo al aislamiento de *Acinetobacter*. Se observó de forma significativa que aquellos pacientes que recibieron aminoglucósidos tenían más riesgo de presentar cepas con alta formación de biofilm. ($p=0.028$ OR 9.37 (IC95% 1.2-67.6).

Once pacientes (42.31%) recibieron tratamiento adecuado posterior a aislamiento, se mostró una tendencia ($p=0.095$) de que los pacientes con cepas de alta producción de biofilm recibieran más frecuente un tratamiento adecuado comparado con aquellos pacientes que presentaron cepas de baja formación.

El tiempo medio de infección por *Acinetobacter* desde la admisión hospitalaria fue de 21 días en los pacientes infectados por cepas de alta producción vs 12 días en pacientes infectados por cepas de baja producción ($p=0.02$).

Diecisiete de los pacientes (25%) presentaron otros aislamientos microbiológicos además de *Acinetobacter*, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de producción de biofilm en las cepas analizadas. Las bacterias aisladas más frecuentes fueron *S. aureus* (dos de ellos oxacilina resistente) , *E coli BLEE*, *S epidermidis*. *Klebsiella pneumonie*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepasea*. Diez de ellas aisladas en secreción bronquial.

Los pacientes con infección por cepas de alta producción de biofilm presentaron en el 71% persistencia en cultivo comparado con el 15% de los pacientes infectados por cepas de baja producción de biofilm ($p= 0.014$)

42% de los pacientes fallecieron, todos excepto uno con diagnóstico de neumonía asociada a ventilación. El 85% de los pacientes infectados por cepas de alta producción de biofilm comparado con el 26% de los pacientes infectados por cepas de baja producción ($p=0.021$)

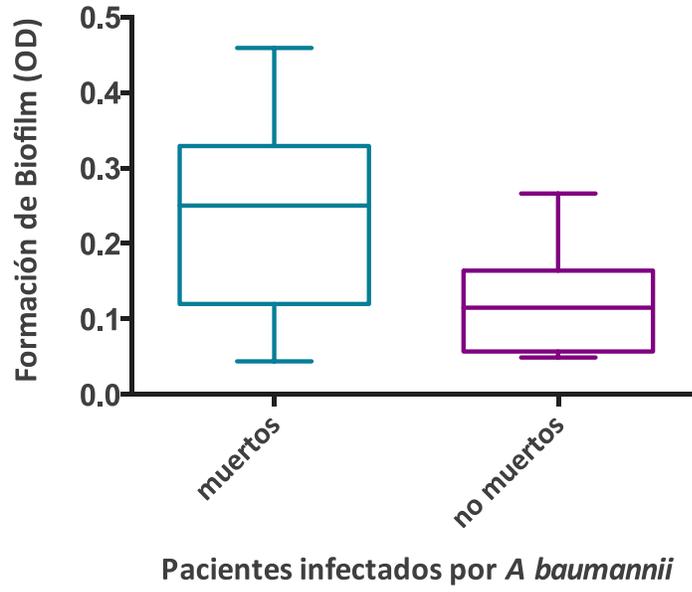
Tabla 2. Características de los pacientes con infección por cepas de *Acinetobacter baumannii* alta y baja productoras de biofilm

Variable	Total de pacientes (n=26)	Alta producción de biofilm (n=7)	Baja producción de biofilm (n=19)	Valor de P
Sexo- n (%)				1.00
Hombre	13 (50%)	3(42%)	10(52%)	
Mujer	13(50%)	4(57%)	9(47%)	
Edad -media(ds)	45(20)	45(20)	45.7(23)	0.941
Comorbilidades-n(%)				0.656
Si	11/25(44%)	3(42%)	11(61%)	
No	14/25(56%)	4(57%)	7(38%)	
Ingreso previo-n(%)	5/25 (20%)	2 (28%)	3(16%)	0.597
Días de estancia intrahospitalaria-media (ds)	31.88 (18.5)	41.85 (20.5)	28 (16.7)	0.013
Servicio terapia intensiva-n(%)	14/25(53%)	6(85%)	8(42%)	0.081
Días estancia terapia intensiva. Media(ds)	23 (18.9)	36(20.7)	14(11.4)	0.001
Uso de aminas vasopresoras-n(%)	15/25(60%)	7(100%)	8(44%)	0.04
Ventilación mecánica invasiva-n(%)	20/25(80%)	7(100%)	13 (72%)	0.274
Días en VMI-media(ds)	17(18.5)	35.7(23.1)	9.7(9.6)	0.011
Intervención quirúrgica-n(%)	20/25(80%)	5(71%)	15(83%)	0.597
Antibiótico previo				
Beta lactámico	23/25(92%)	6(85%)	17(94%)	0.490
Aminoglucósido	9(26%)	5(71%)	4(21%)	0.028
Quinolonas	5(19%)	2(28%)	3(15%)	0.588
Macrólidos	1(3%)	0(0%)	1(5%)	1.00
Otros antibióticos	19(73%)	6(85%)	13(68%)	0.629
Antibiótico adecuado post-cultivo n(%)	11(42%)	5(71%)	6(31%)	0.095

Tabla 3. Desenlaces en pacientes infectados por cepas con alta y baja producción de biofilm.

Variable	Total de pacientes (n=26)	Alta producción de biofilm (n=7)	Baja producción de biofilm (n=19)	Valor de P
Días a cultivo positivo-media (ds)	15.16(8.35)	21(10.31)	12(6.43)	0.02
Biofilm OD-media(ds)	0.167 (0.116)	0.326(0.83)	0.108(0.56)	0.0001
Origen cultivo n(%)				
Liq biológico	12 (46 %)	1(14%)	11(57%)	0.081
Sec bronquial	15(57%)	7(100%)	8(42%)	0.010
Hemocultivos	1(3%)	0 (0%)	1(5%)	
Otros aislamientos	17(25%)	6(85%)	11(61%)	0.362
<i>Stafilococo aureus</i>	5 (19%)	1(14%)	4(21%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3(11%)	1(14%)	2(10%)	
Persistencia de cultivo	8(30%)	5(71%)	3(15%)	0.014
Mortalidad	11(42.31%)	6(85%)	5(26%)	0.021
Mortalidad atribuible	10(40%)	6(85%)	4(22%)	0.007

Figura 4. Mortalidad en pacientes infectados por *A. baumannii* de acuerdo a cantidad de producción de biofilm



DISCUSION

En décadas recientes, se ha observado un incremento importante de infecciones por *A. baumannii* a nivel hospitalario, con tasas de resistencia elevadas. (57) La formación de biofilm es una característica importante que se ha considerado como una estrategia que utiliza la bacteria para sobrevivir, con implicaciones en la patogenicidad, la cual de acuerdo a la evidencia epidemiológica, juega un papel importante en las enfermedades infecciosas por *Acinetobacter* en pacientes con fibrosis quística, periodontitis, bacteremias e infecciones de vías urinarias, por su habilidad de permanecer en dispositivos médicos. (4, 24, 58) De acuerdo a esto en este estudio se evaluó la producción de biofilm por *A. baumannii* y su asociación con mortalidad y persistencia en cultivos.

De manera similar a reportes previos (59), todas las cepas de *A. baumannii* formaron biofilm, sin embargo, la cantidad fue variable. Se observó mayor producción en cepas aisladas de secreción bronquial, lo cual probablemente favorecido por la presencia de tubo endotraqueal.

El aislamiento microbiológico en los pacientes con cepas con alta formación de biofilm se realizó de forma más tardía, lo cual podría estar favorecido por la presencia de un biofilm maduro. Se han descrito diferentes etapas en la formación de biofilm; en etapas tempranas se genera un biofilm lábil, mientras que a medida que se completa el proceso se produce un biofilm maduro más difícil de erradicar. Wroblewska, et al. (60) sugieren que la habilidad de la cepa de formar biofilm puede ser tiempo dependiente; presenta dos casos de infección por *Acinetobacter*, donde se realizó cultivo seriado al mes y a los 5 días, mostrando mayor producción de biofilm en el segundo cultivo.

El uso previo de aminoglucósidos se relacionó con cepas de alta producción de biofilm. Rodríguez-Baño et al. (61), en un estudio de 92 cepas de *A. baumannii* reportó el mismo hallazgo, al parecer el uso de este tipo de antibiótico ejerce una presión de selección diferente en la formación de biofilm, independientemente de la susceptibilidad in vitro.

Las especies de *A. baumannii* con alta producción de biofilm se asociaron a persistencia en el cultivo. Se ha reportado formación de biofilm en microorganismos que causan infecciones relacionadas a dispositivos y/o infecciones crónicas siendo extremadamente difíciles de erradicar; Hall-Stoodley et al. (62) demostraron la presencia de biofilm en muestras de superficie mucosa de niños con otitis crónica supurativa, Bjarnsholt et al. (63) evaluaron la orientación y distribución de *Pseudomonas aeruginosa* en zonas de vías aéreas superiores e inferiores en pulmones de pacientes con fibrosis quística con infección crónica por este microorganismo, demostrando que todas las colonias bacterianas estaban embebidas en un moco espeso en la zona de conducción (vías aéreas superiores) explicándolo como un “reservorio” donde la bacteria se organiza en biofilm mucoso, protegida contra defensas del huésped y agentes antimicrobianos.

Se ha atribuido al biofilm formado por *S. aureus* como uno de los factores más importantes en el desarrollo de formas crónicas de osteomielitis. (64)

Se han dado varias explicaciones por lo que las infecciones difíciles de erradicar se asocia a biofilm; secundario a menor susceptibilidad a agentes antimicrobianos, por arquitectura tridimensional del biofilm con varias capas, disminución en la tasa de crecimiento bacteriano y por capacidad de neutralizar a algunos agentes antimicrobianos. Stewart et al. (65) demostraron la presencia de áreas dentro del biofilm con bacterias en fase estacionaria o inclusive “dormida”. Lo cual minimiza el efecto de la mayoría de los antibióticos al actuar justo en las fases en crecimiento bacteriano. (28) Mulcahy et al demostraron la propiedad de quelar del DNA extracelular en la matriz de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y neutralizar la actividad de antimicrobianos como tobramicina. Leid et al estudiaron in vitro la interacción de leucocitos humanos en biofilms de 2 días (tempranos) y de 7 días (maduros) de *S. aureus* en condiciones dinámicas y estáticas, demostraron que los leucocitos son capaces de penetrar el biofilm pero incapaces de fagocitar la bacteria presente en el biofilm, lo cual sigue la presencia de otro mecanismo que inhibe la función normal del leucocito. Alhede et al. (38) demostraron que *Pseudomonas aeruginosa* utiliza un sistema de comunicación quórum sensum para causar una respuesta agresiva al producir factores de virulencia, como ramnolípidos, los cuales se unen al biofilm formando un escudo mortal el cual mata a los

polimorfonucleares al contacto. Kownatzki et al. (66) demostraron que el esputo de los pacientes con fibrosis quística infectados por *Pseudomonas aeruginosa* contenía ramnolípidos y su alta concentración correlacionaba con pobre estado clínico.

Los pacientes infectados con alto biofilm presentaron mayor mortalidad, secundario a neumonía asociado a ventilador. En la literatura solo existe un estudio donde se correlacionó la presencia de biofilm en *Acinetobacter* con mortalidad; Rodríguez-Baño et al. (61) evaluaron 92 cepas de *A. baumannii* en una cohorte multicéntrica donde reportan una tendencia no significativa de menor mortalidad en pacientes infectados por cepas de alta producción de biofilm. Sin embargo los reportes en *Pseudomonas aeruginosa* sugieren que la producción de biofilm es un factor de importante de patogenicidad, lo cual permite a la bacteria por medio del sistema regulatorio quorum sensing aumentar transcripción de factores de virulencia, generando falta de erradicación y mayor daño tisular. (67) Se requieren más estudios para corroborar los hallazgos.

La ventilación mecánica invasiva continua siendo una de las causas principales de morbi y mortalidad en pacientes en estado crítica. Dado el papel que puede tener el tubo endotraqueal en la introducción de infección a los pulmonares, se han realizado varias investigaciones con respecto al uso de tubos endotraqueales hechos con materiales que resisten la formación de biofilm microbiano. Olson et al. (68), demostraron que los tubos endotraqueales cubiertos de plata reducen el riesgo de neumonía asociada a ventilación en modelos animales. Kollef et al. (69) demostraron que , en pacientes intubados por 24 horas o más, los tubos endotraqueales cubiertos de plata, disminuyen significativamente la tasa de neumonía asociada a ventilador confirmada microbiológicamente comparado con pacientes entubados con tubos no cubiertos de plata. Sin embargo no se ha estandarizado el uso de estos tubos endotraqueales ya que su costo es casi de 10 a 20 veces más que el tubo no cubierto de plata. Recientemente se ha demostrado que tubos endotraqueales cubiertos por combinación de antisépticos llamada Gardina y Gendina protegen contra colonización de bacterias formadoras de biofilm, siendo más efectivos que aquellos cubiertos por plata. (70) Sin embargo se requieren más estudios para corroborar dichos hallazgos.

Las limitaciones del estudio es que es retrospectivo, por lo tanto no fue posible distinguir claramente entre infección y colonización; la toma de cultivos subsecuentes, la elección del tratamiento, dosis y tiempo no fue estandarizada sin a juicio del médico tratante; el número de pacientes estudiados fue limitado, lo cual no permitio realizar un análisis multivariado

CONCLUSIONES

Todas las cepas de *A. baumannii* fueron capaces de producir biofilm *in vitro*, sin embargo la cantidad fue variable. Esto puede ser un mecanismo de patogénesis importante sobre todo en pacientes con neumonía asociada a ventilador.

Las cepas con mayor producción de biofilm se identificaron de forma más tardía comparado con las cepas de baja producción, lo cual podría estar relacionado a las etapas en la formación de biofilm.

El uso previo de aminoglucósidos se asoció con cepas de alta producción de biofilm. Lo cual pareciera ser secundario a presión de selección, independientemente de la susceptibilidad a dicho fármaco.

Las especies de *A. baumannii* con alta producción de biofilm se asociaron a persistencia en el cultivo y mayor mortalidad, particularmente en pacientes con neumonía asociada a ventilador.

Se requieren más estudios para definir el papel del biofilm en la patogenia de *A. baumannii*, así como definir el uso de tubos endotraqueales cubiertos de plata o antisépticos como medida costo-beneficio en la disminución de colonización e infección por bacterias productoras de biofilm.

BIBLIOGRAFIA

1. Giamarellou H, et al *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. *Inter J. Antimicrob Agents* 2008, 32: 106-119.
2. Margalis L, et al *Acinetobacter baumannii*: epidemiology antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical Infectious Diseases* 2008, 46(8):1254-1263.
3. Playford EG, Craig JC, Iredell JR, Carbapenem-resistant *Acinetobacter* Baumann in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *The Journal of hospital Infection* 2007, 65 (3):204-211.
4. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*, 2009 ; 4: 273-278.
5. Martí S, et al. Biofilm formation at the solid- liquid- air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Reserch Notes*, 2011,4:5
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
7. Rofovska T, Lazareva MF. Microbiological characteristics of biofilm purifying hydrogen sulphide containing sewage. 1961
8. Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. University of Copenhagen, 1977.
9. Costerton JW, Geesey GS, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238:86-95.
10. McCoy WF, Bryers JD, Robbins J, Costerton JW. Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol* 1981; 27:910-7
11. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GS, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41: 435-64.
12. Stoodley, P. K. Sauer, D.G Davies, and Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
13. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews* 2003; 2: 114-122.
14. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:49-79
15. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* 2003; 4: 219.
16. Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4457-64.
17. Reimann C, Ginet N, Michel L, Kell C, Michaux P, Krishanapillai V, et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 2002; 148 (Pt4): 923-32
18. Hentzer M, Eberl L, Givskov M. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms* 2005;2:37-61.
19. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. *J. Bacteriol* 2008; 190 (3):1036-44
20. Cucarella C., Solano J, Valle B, Amorena, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183: 2888-2896.
21. McQueary C, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* Biofilms: Variations among strains and correlations with other cell properties. *The Journal of Microbiology* 2011;49(2): 243-250
22. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:49-54
23. Gaddy, J, Tomaras A, Actis L.A, et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 2008; 8: 216.
24. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*

2002; 15:167-93

25. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003; 5: 1213-9
26. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002; 416:740-3
27. Walters MC III, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 317-23.
28. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Mewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in biofilms. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000213.
29. Vransky JD, Stewart PS, Suci PS. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid transport characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 41: 1352-58
30. Larsen, T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol. Immunol.* 2002; 5: 267-71
31. Stenberg, C. et al. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 4108-4117.
32. DeBeer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotech. Bioeng* 1994; 43: 1131-38
33. Shigeta, MG, et al. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* 1997; 43: 340-345
34. Shigeta M, Kimatsuzawa M, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents. *Chemotherapy* 1997;43: 137-141
35. Tankara G, et al . Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents: beta-lactams and fluoroquinolones. *Chemotherapy* 1999; 45: 28-36.
36. Parry JD. Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol* 2004; 54:167-96.
37. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8
38. Alhede M, Bjanrmsholt T, Jensen PO, Phipps RK, Moser C, Christophersen L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology* 2009; 155: 3500-8
39. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176: 269-75.
40. Manefield M, Turner SL. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* 2002; 148:3762-4
41. Allesen-Holm M , Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 2006; 59: 1114-28.
42. Burmolle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Cristensen L, Homoe P, Tvede M, et al. Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity-monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59_324-336.
43. Ehrlich, GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ. Et al. Mucosal biofilm formation in middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 2002; 287: 1710-1715
44. Martinez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1526-1533.
45. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J, et al . Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44
46. Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66: 155-8
47. Silverstein A, Donatucci CF: Bacterial biofilms and implantable prosthetic devices. *Int J Import Res* 2003; 15 (Suppl 5) : S150-4

48. Nassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(4): 305-3011
49. Christensen GD, Simpson WA, Younger JA, et al. Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1995; 22: 996-1006.
50. Stepanovic S, Vukovi D, Hola V et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS* 2007; 115: 891-9.
51. Freeman J, Falkiner FR, Keane CT. New method for detectin slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42:872-4
52. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37:318-26
53. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 322-32
54. Spoering A, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183: 6746-51
55. Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:640-66.
56. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicro Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
57. Tognim MCB, Andrade SS, Silbert S. Resistance trends of *Acinetobacter* spp in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resisnatnt strains: five year report of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Int J Infect Dis* 2004;8: 284-291
58. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, Serruys E, Quint WGV, Belkum AV. Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR fingerprinting. *J Hosp Infect* 25 1993;25: 15-32.
59. Breij A, Dijnshoorn L, Legendijk E, Van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, Wolterbeek R, Van der Broek P, Nibbering P. Do Biofilm Formation and Interactions with Human cells explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? 2010. *PLoS ONE* 2010;5(5)e10732
60. Wroblewska M, Sawicka-Grzelak A, Marchel H, Luczak H, Sivan A. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:140-144
61. Rodríguez Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneós JM, Pachón J, Pascual A, Martínez-Martínez L, McQuerry C, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:276-278.
62. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA-J Am Med Assoc* 2006;296:202-211
63. Bjarnsholt T, Jensen PO, Jensen PO, Giandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, HOiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulm* 2009; 44:547-558
64. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:13-22
65. Stewart PD, Franklin MJ, Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:199-210
66. Kownatzki R, Tummler B, Doring G. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* exoproteases inhibit human neutrophil chemiluminescence. *Infect Immun* 1984;44:587-591.
67. Haj Khalifa B, MOissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanism and modes of regulation 2011;69(4):393-403.
68. Olson ME, Harmon, BG, Kollef MH. Silver coated endotracheal tubes associated with reduced bacterial burden in the lungs of mechanically ventilated dogs. *Chest* 2002; 121:863-70
69. 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 NASENT randomized trial. *JAMA* 2008;300:805-13-

70. Raad II, Mohamed JA, Meitzel RA, Jiang Y, Dvorak TI, et al The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. *Biomaterials* 2011;32: 2689-2694.