

Prontosan®: actividad comparativa con clorhexidina sobre la formación de biofilms y actividad bactericida sobre biofilms producidos por bacterias nosocomiales multirresistentes y/o con potencial epidémico.

Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de Macarena. Sevilla
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Sevilla

Informe final

Dr. Álvaro Pascual

Director de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- Cepas bacterianas y clones.

2.2.- Test de sensibilidad

2.3.- Formación de biofilms

2.4.- Efecto de la exposición de Prontosan® sobre la formación de biofilms

2.5.- Actividad de Prontosan® sobre biofilms con distinto grado de madurez

3. RESULTADOS

3.1.- Sensibilidad in Vitro a biocidas. Microdilución en caldo

3.2.- Formación de biofilms y efecto de la exposición de Prontosan® sobre dicha formación

3.3.- Actividad de Prontosan® sobre biofilms con distinto grado de madurez

3.3.1.- 24 horas

3.3.2.- 48 horas

3.3.3.- 72 horas

3.3.4.- 1 semana

4. CONCLUSIONES

5. BIBLIOGRAFÍA

1. OBJETIVOS

1º Determinar el efecto de Prontosan® y clorhexidina al 2% (comparador) sobre la capacidad para formar biofilms de aislados clínicos representativos de clones de bacterias nosocomiales multirresistentes y/o con potencial epidémico.

2º Determinar la actividad de Prontosan® y clorhexidina al 2% (comparador) sobre biofilms de distintos grados de madurez formados por aislados clínicos representativos de clones de bacterias nosocomiales multirresistentes y/o con potencial epidémico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.-Cepas bacterianas y clones.

Se incluyen cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* representativas de los clones multirresistentes y/o de alto riesgo más prevalentes en el ámbito hospitalario (Tabla 1). La cepa de colección *K. pneumoniae* ATCC 700603 se utilizará como cepa productora de biofilms (control positivo) y la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 como cepa no productora de biofilm (control negativo):

Tabla 1. Cepas de estudio

Nº	Especie	Clon	Característica	Referencia
1	<i>K. pneumoniae</i>	ST-716	BLEE tipo CTX-M-15	Laboratorio PIRASOA
2	<i>K. pneumoniae</i>	ST-258	Carbapenemasa tipo KPC-3	Laboratorio PIRASOA
3	<i>A. baumannii</i>	ST-2	Carbapenemasa tipo OXA-23	Laboratorio PIRASOA
4	<i>P. aeruginosa</i>	ST-175	Carbapenemasa tipo VIM-2	Viedma E <i>et al.</i> , Emerg Infect Dis 2012
5	<i>S. aureus</i>	Complejo clonal 5	Resistencia a meticilina (<i>mecA</i>)	Velasco C <i>et al.</i> , J Hosp Infect 2012
6	<i>E. faecalis</i>	Complejo clonal 2	Clon de alto riesgo	Ruiz-Garbajosa P <i>et al.</i> , EIMC 2007
7	<i>K. pneumoniae</i>		ATCC 700603	
8	<i>S. epidermidis</i>		ATCC 12228	

2.2.-Tests de sensibilidad

Con el fin de determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas a **Prontosan®** [0,1% Polyaminopropyl Biguanide (polihexanide) y a clorhexidina al 2%, se utilizó el método de **microdilución** en caldo Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones del **CLSI**¹ para antimicrobianos. Para cada cepa se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), expresadas en mg/L. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en días distintos.

2.3.- Formación de biofilms

Los ensayos de formación de biofilms se realizaron por triplicado sobre placas de poliestireno usando el método colorimétrico con cristal violeta y el método basado en el recuento de bacterias vivas.

Para ambos métodos, los pocillos se inocularon con 0.2 mL de una suspensión bacteriana en caldo Mueller Hinton con una concentración bacteriana de 10^8 ufc/mL. Tras 24 horas de incubación a 37°C, las bacterias no adheridas se eliminaron mediante tres lavados con PBS. Las bacterias adheridas (biofilm formado) se fijaron con metanol al 99% durante 15 minutos y se tiñeron con cristal violeta al 0.1% durante 30 min. Tras disolver en 150 μ L de ácido acético al 33%, la cantidad de biofilm formada se calculó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 595 nm. Como controles y para normalización de la técnica, se usaron la cepa estándar *K. pneumoniae* ATCC 700603 (control positivo de formación de biofilms) y la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 (control negativo no productora de biofilm)².

En paralelo, se realizó un recuento de las bacterias vivas adheridas a los pocillos de la placa de poliestireno. Para ello, tras lavado de las bacterias no adheridas con PBS, las bacterias productoras de biofilm se midieron añadiendo 200 μ L de PBS y sonicando en el baño de sonicación durante 5 minutos. Realizamos diluciones seriadas y siembras en placas de agar Mueller-Hinton para la determinación de las concentraciones bacterianas (UFC/mL).

Las concentraciones de bacterias viables fueron representadas como la media \pm desviación estándar (Log UFC/mL), y la producción de biofilm fue representada como la media \pm desviación estándar del porcentaje respecto a su control (crecimiento sin tratamiento, tomando éste como el 100%). Las diferencias entre las medias de los

distintos grupos fueron comparadas mediante el test paramétrico *T-Student* usando el programa SPSS v19.0, tomando como significativo una $p < 0,05$.

2.4.-Efecto del Prontosan® sobre la formación de biofilms

El efecto del Prontosan® sobre la capacidad de formación de biofilm se realizó determinando la capacidad de formación de biofilm de los aislados en presencia de concentraciones subinhibitorias de Prontosan® y clorhexidina al 2% (comparador). La cantidad de **biofilm** formada y el recuento de **bacterias viables** se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente, añadiendo a los 200 μL de la suspensión bacteriana inicial las concentraciones de Prontosan® y clorhexidina correspondientes a 0,25 veces la CMI de cada una de las cepas.

2.5.-Actividad de Prontosan® sobre biofilms con distinto grado de madurez

Para determinar la capacidad de Prontosan® de erradicar la formación de biofilms con distinto grado o en distinta fase de madurez (formación durante 24 horas, 48 horas, 72 horas y una semana), los biofilms se formaron siguiendo la metodología descrita anteriormente. Posteriormente, fueron expuestos durante 15 minutos a distintas concentraciones de Prontosan® y clorhexidina al 2% (comparador). Las concentraciones usadas para cada una de las cepas fueron 0,25xCMI (subinhibitoria), 1xCMI, y concentración comercial del producto. Tras los 15 minutos de exposición y posterior lavado con PBS, se determinaron la cantidad de biofilm formada por espectrofotometría y se realizó un recuento de bacterias viables siguiendo la metodología anterior.

3. RESULTADOS

3.1.- Sensibilidad *in Vitro*. Microdilución en caldo

Como se muestra en la Tabla 1, los valores de **CMI** y **CMB** obtenidos fueron variables, de 1 a 8 mg/L para Prontosan® y de 4 a 32 mg/L para clorhexidina. Los valores de **CMB** fueron iguales a los de **CMI** para todas las cepas testadas (Tabla 1).

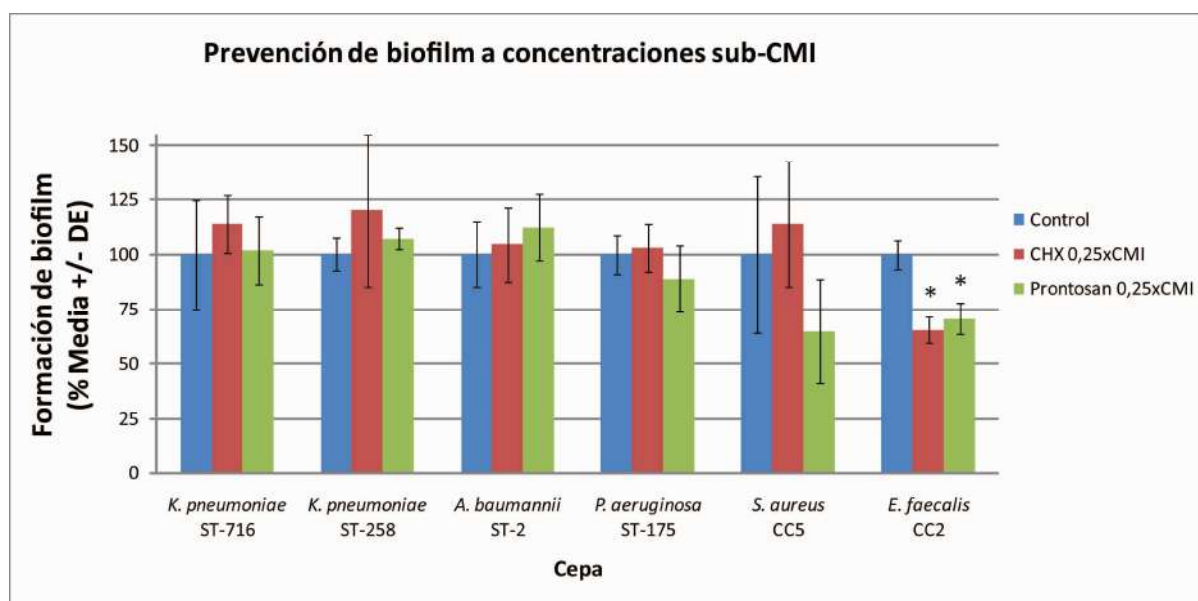
Tabla 1. Valores de CMI/CMB de Prontosan® y clorhexidina frente a las cepas estudiadas.

CEPA		Prontosan®		Clorhexidina al 2%	
		CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
1	<i>K. pneumoniae</i> ST-716	1	1	8	8
2	<i>K. pneumoniae</i> ST-258	2	2	8	8
3	<i>A. baumannii</i> ST-2	4	4	8	8
4	<i>P. aeruginosa</i> ST-175	8	8	16	16
5	<i>S. aureus</i> CC5	2	2	4	4
6	<i>E. faecalis</i> CC2	2	2	4	4
7	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	2	2	32	32
8	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2	2	16	16

3.2.- Formación de biofilms y efecto de la exposición de Prontosan® sobre dicha formación.

Las 6 cepas bacterianas incluidas en el estudio mostraron la misma capacidad para producir biofilm (Figura 1). La exposición a concentraciones sub-inhedorias (0,25xCMi) de Prontosan® y clorhexidina disminuyó la capacidad de formación de biofilm de *P. aeruginosa* ST-175, *S. aureus* CC5 y *E. faecalis* CC2; aunque sólo fue estadísticamente significativa en la cepa de *E. faecalis*.

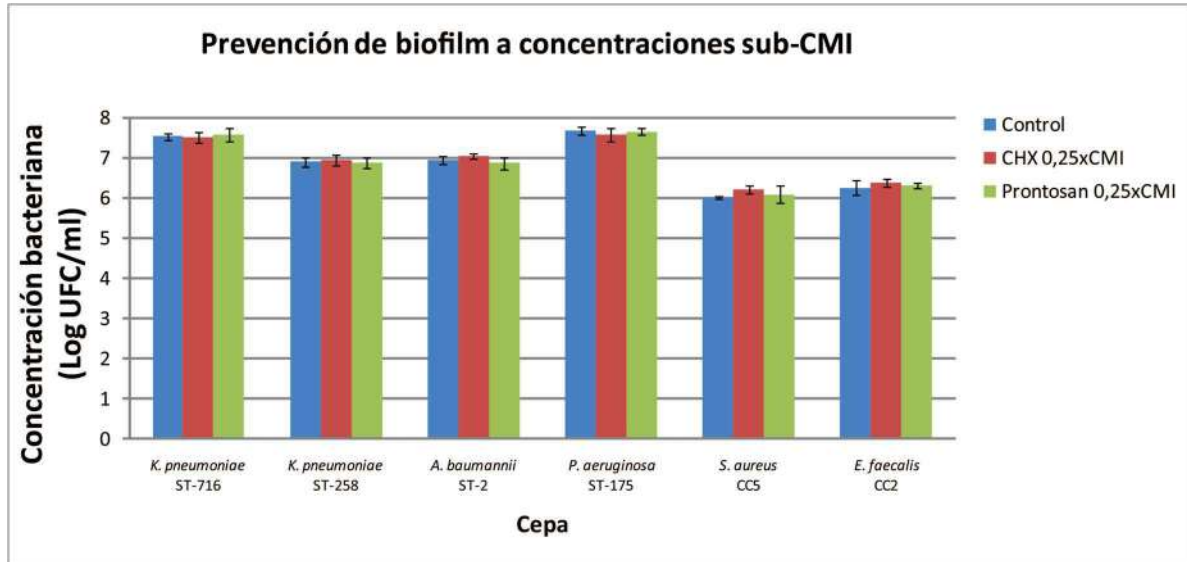
Figura 1. Formación de biofilm en ausencia y en presencia de Prontosan® y clorhexidina (CHX).



*p<0,05 respecto a su control.

Con respecto al recuento bacteriano, la exposición a concentraciones sub-inhedorias (0,25xCMi) de Prontosan® y clorhexidina no tuvo ningún efecto sobre los recuentos de bacterias viables para ninguna de las cepas estudiadas (Figura 2).

Figura 2. Recuento de bacterias viables en ausencia y en presencia de Prontosan® y clorhexidina (CHX).



*p<0,05 respecto a su control.

3.3.- Actividad de Prontosan® sobre biofilms con distinto grado de madurez

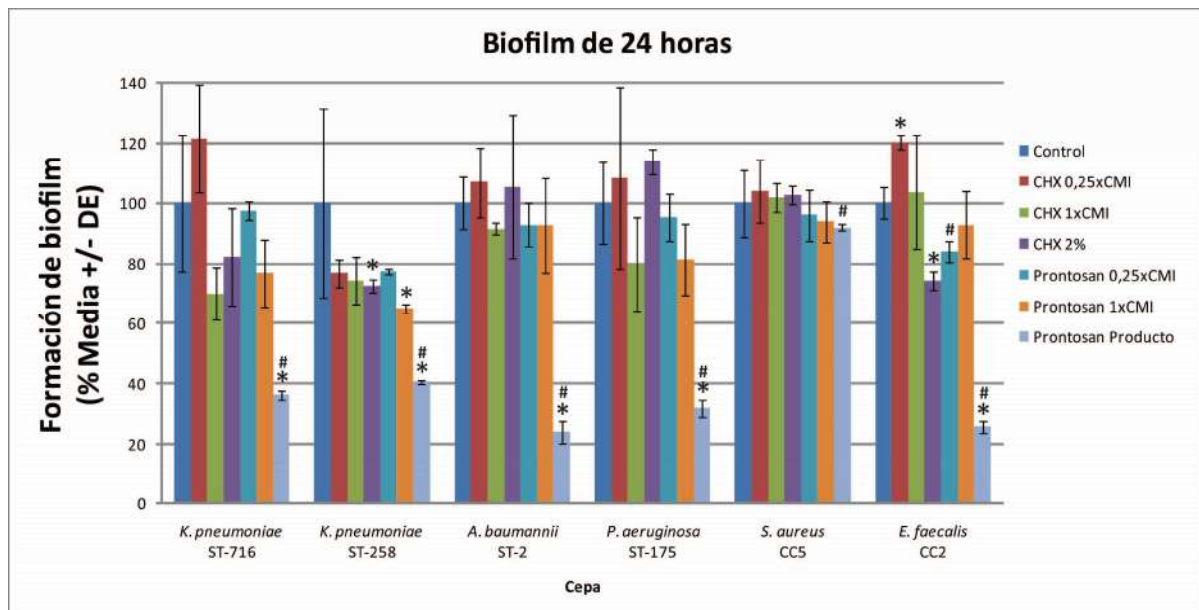
Los resultados de la capacidad de Prontosan® de erradicar o inhibir biofilms con distinto grado de madurez fueron diferentes en las distintas fases de madurez de los mismos (24, 48, y 72 horas y una semana).

3.3.1.- 24 horas.

En los biofilms de 24 horas de formación, ni Prontosan® ni clorhexidina disminuyeron significativamente la cantidad de biofilm formada a 0,25x CMI y a 1x CMI. Curiosamente, clorhexidina a 0,25x CMI aumentó la cantidad de biofilm en la cepa *E. faecalis*. Este efecto ya se ha descrito previamente en otros trabajos donde *K. pneumoniae* aumenta la formación de biocapas en superficies inertes con la exposición a biocidas y *E. coli* aumenta la capacidad de formación de biocapas a concentraciones subletales de biocidas usados comúnmente en alimentación (fosfato trisódico, nitrato sódico, e hipoclorito sódico), así como la resistencia a algunos antimicrobianos³.

Clorhexidina al 2% disminuyó el biofilm de *K. pneumoniae* ST-258 y *E. faecalis*, mientras que Prontosan® puro disminuyó el de todas las cepas estudiadas excepto *S. aureus*. Para todas las cepas, Prontosan® puro fue más eficaz que CHX al 2%.

Figura 3. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre biofilms de 24 horas.

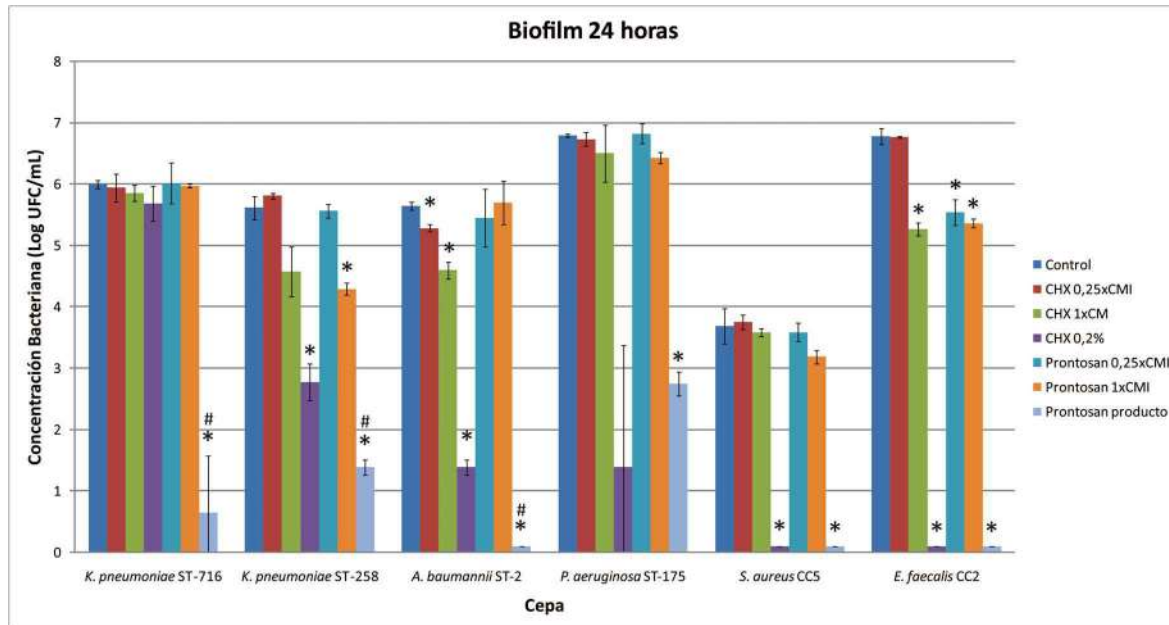


*p<0,05 respecto a su control.

#p<0,05 respecto a la misma concentración de clorhexidina.

Con respecto al recuento de bacterias viables, la exposición a concentraciones de 0,25x CMI y 1x CMI de Prontosan® y clorhexidina no varió las concentraciones bacterianas obtenidas para ninguna de las cepas, excepto clorhexidina en *A. baumannii* y Prontosan® en *E. faecalis*. Con respecto a los productos puros, clorhexidina tuvo efecto en todas las cepas excepto *K. pneumoniae* ST-716 y *P. aeruginosa*, y Prontosan® en todas las cepas estudiadas. Prontosan® mejoró a clorhexidina en las dos cepas de *K. pneumoniae* y en *A. baumannii*.

Figura 4. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre los recuentos de bacterias viables en biofilms de 24 horas.



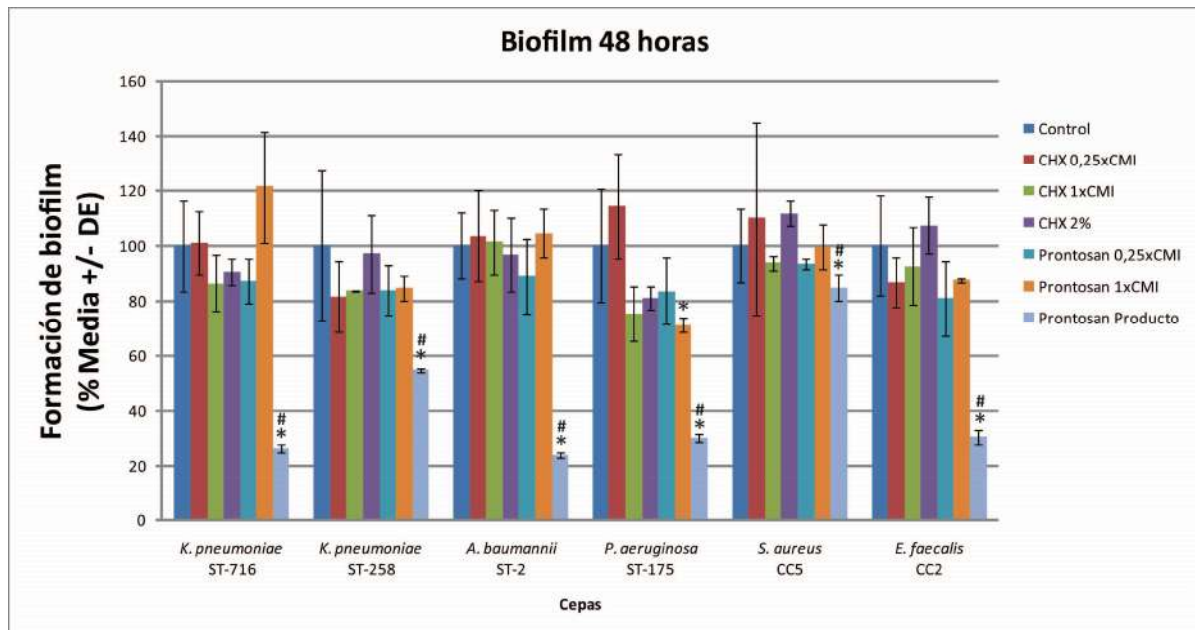
* $p < 0,05$ respecto a su control.

$p < 0,05$ respecto a la misma concentración de clorhexidina.

3.3.2.- 48 horas.

Con respecto a la formación de biofilm, en un biofilm de 48 horas de formación, ni Prontosan® ni clorhexidina disminuyeron significativamente la cantidad de biofilm formada a 0,25xCMi y a 1xCMi (Figura 5). Clorhexidina al 2% tampoco disminuyó significativamente la cantidad de biofilm formada en ninguna de las cepas, al contrario que Prontosan®, que lo hizo en todas las cepas y mejoró a clorhexidina.

Figura 5. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre biofilms de 48 horas.

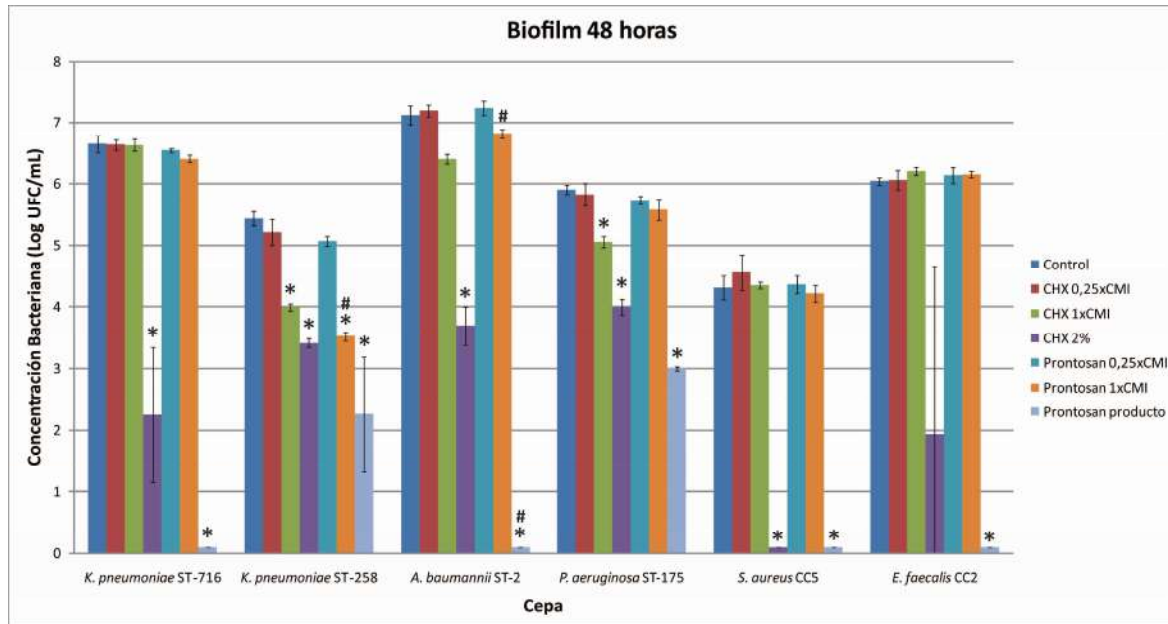


* $p < 0,05$ respecto a su control.

$p < 0,05$ respecto a la misma concentración de clorhexidina.

Con respecto al recuento bacteriano, la exposición a concentraciones de 0,25xCMI de Prontosan® y clorhexidina no presentó efecto bactericida (Figura 6). A una concentración de 1xCMI, clorhexidina tuvo efecto en *K. pneumoniae* ST-258 y en *P. aeruginosa*, y Prontosan® en *K. pneumoniae* ST-258. Prontosan® fue peor a esta concentración que clorhexidina frente a *A. baumannii*. A las concentraciones comerciales tanto clorhexidina como Prontosan® presentaron actividad bactericida en todas las cepas estudiadas. Prontosan® mejoró a clorhexidina frente a *A. baumannii* en esta concentración.

Figura 6. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre los recuentos de bacterias viables en biofilms de 48 horas



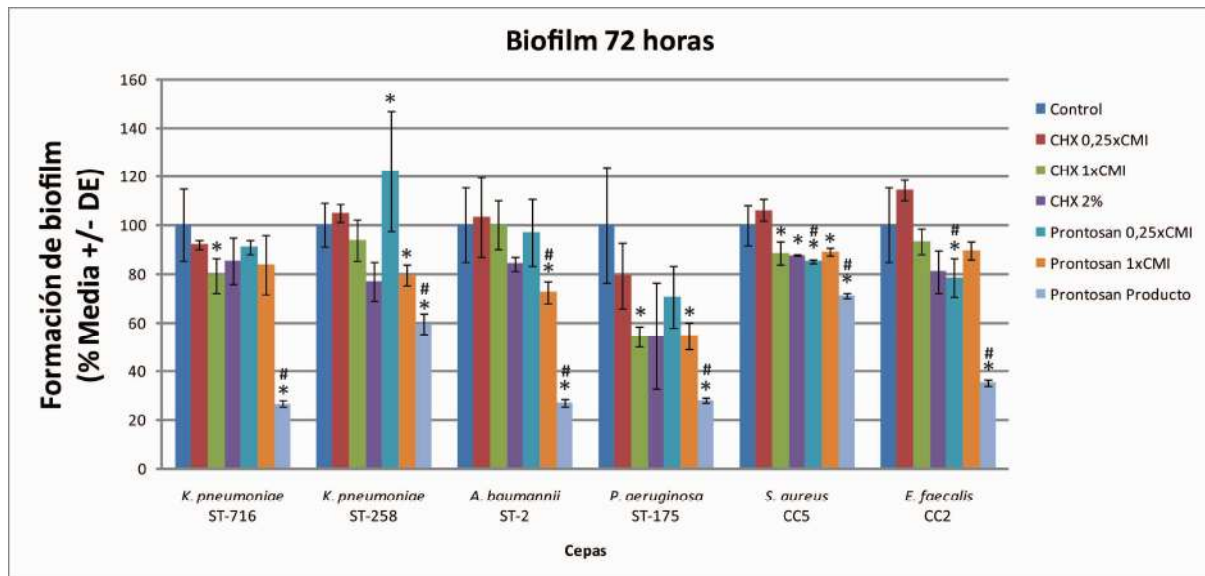
* $p < 0,05$ respecto a su control.

$p < 0,05$ respecto a la misma concentración de clorhexidina.

3.3.3.- 72 horas.

Con respecto a la formación de biofilm, en un biofilm de 72 horas de formación los resultados son similares excepto para la cepa de *S. aureus*, que parece debilitarse conforme aumenta el tiempo (Figura 7). Clorhexidina no disminuyó la cantidad de biofilm formada a 0,25xCMi, mientras que Prontosan® lo hizo en *S. aureus* y *E. faecalis*. Como curiosidad, Prontosan® aumentó a esta concentración la cantidad de biofilm en *K. pneumoniae* ST-258. A una concentración de 1xCMi, clorhexidina tuvo eficacia en *K. pneumoniae* ST-716, *P. aeruginosa*, y *S. aureus*, mientras que Prontosan® la tuvo frente a *K. pneumoniae* ST-258, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, y *S. aureus*. A las concentraciones comerciales, clorhexidina tuvo efecto frente a *S. aureus*, y Prontosan® presentó efecto y mejoró a clorhexidina frente a todas las cepas estudiadas.

Figura 7. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre biofilms de 72 horas.

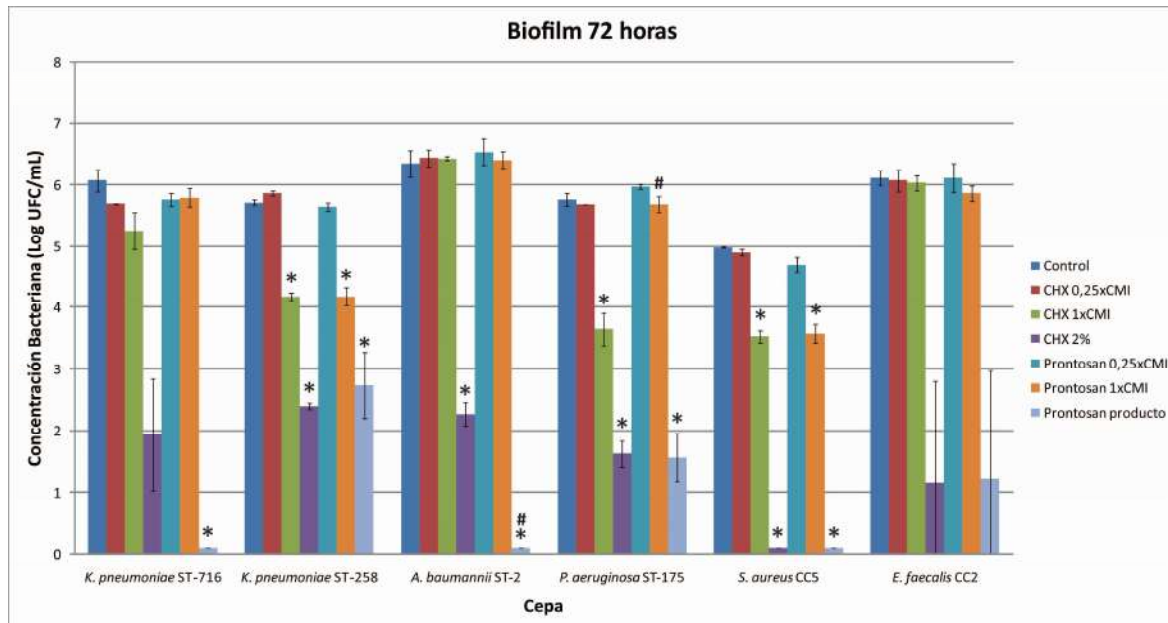


*p<0,05 respecto a su control.

#p<0,05 respecto a la misma concentración de clorhexidina.

Con respecto al recuento bacteriano, la exposición a concentraciones de 0,25x CMI de Prontosan® y clorhexidina no presentó efecto bactericida. A concentraciones de 1x CMI, clorhexidina presentó efecto frente a *K. pneumoniae* ST-258, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, y Prontosan® frente a *K. pneumoniae* ST-258 y *S. aureus*. Clorhexidina a esta concentración mejoró el resultado de Prontosan® frente a *P. aeruginosa*. Con las concentraciones comerciales, hubo actividad bactericida para todas las cepas estudiadas tanto con clorhexidina como con Prontosan®, si bien debido a altas desviaciones estándares no fueron significativas para *E. faecalis* con los dos biocidas y para *K. pneumoniae* ST-716 con clorhexidina. Prontosan® mejoró a clorhexidina a concentraciones comerciales frente a *A. baumannii*.

Figura 8. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre los recuentos de bacterias viables en biofilms de 72 horas



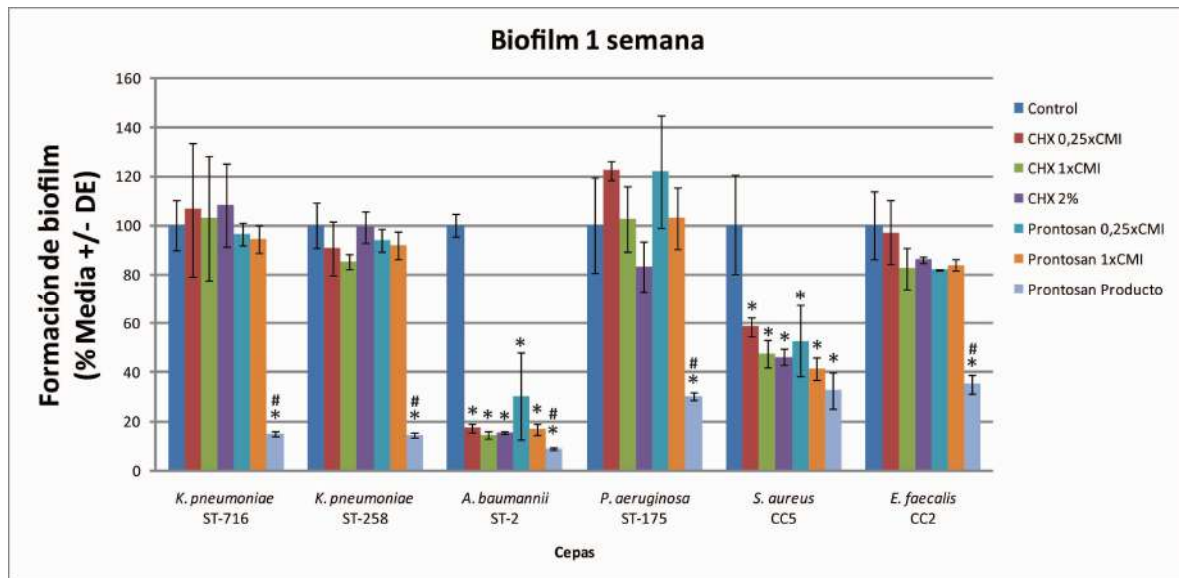
*p<0,05 respecto a su control.

#p<0,05 respecto a la misma concentración de clorhexidina.

3.3.4.- 1 semana.

Con respecto a la formación de biofilm, en un biofilm de 1 semana de formación las cepas de *A. baumannii* y *S. aureus* presentan claramente un biofilm menos resistente a la actividad de los biocidas (Figura 9). En estas dos cepas, tanto clorhexidina como Prontosan® disminuyeron el biofilm a 0,25xCMI y a 1xCMI, mientras que en el resto de las cepas no lo hicieron. El mismo resultado se obtuvo con la concentración de clorhexidina al 2%. Prontosan® a la concentración comercial tuvo eficacia frente a todas las cepas estudiadas, siendo significativamente mejor que clorhexidina en todas ellas excepto en *S. aureus*.

Figura 9. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre biofilms de 1 semana.

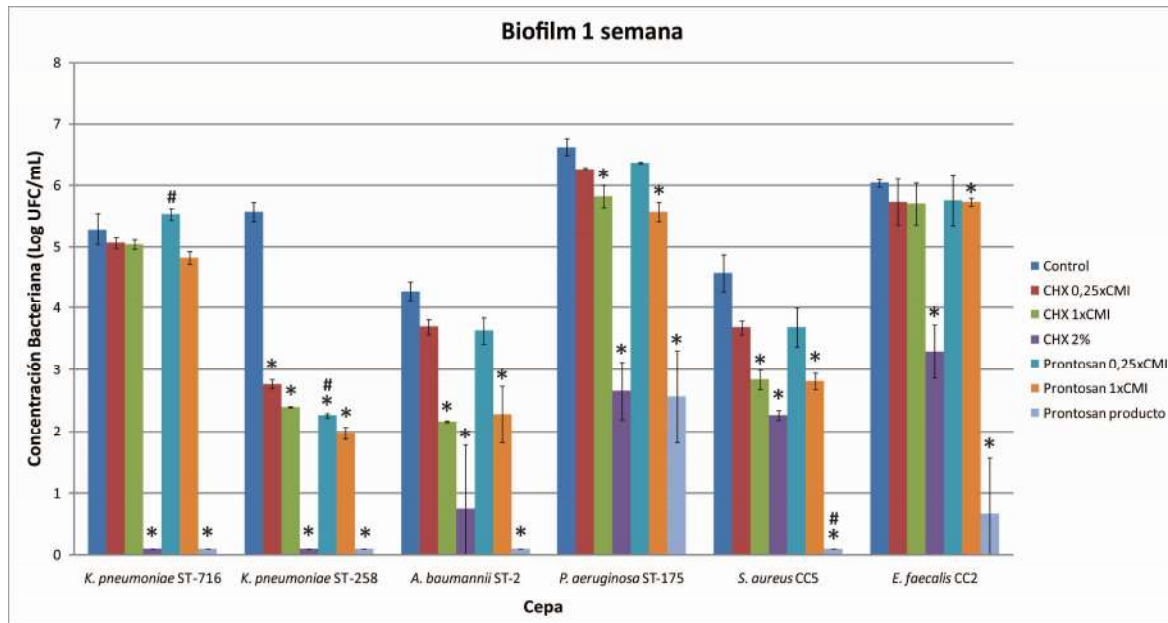


*p<0,05 respecto a su control.

#p<0,05 respecto a la misma concentración de clorhexidina.

Con respecto al recuento bacteriano, las cepas tras una formación de biofilm de 1 semana también fueron más sensibles en general a la actividad bactericida de los biocidas. La exposición a concentraciones de 0,25xCMl de Prontosan® y clorhexidina presentó efecto bactericida sólo en *K. pneumoniae* ST-258. A 1xCMl, clorhexidina presentó actividad en todas excepto en *K. pneumoniae* ST-716 y *E. faecalis*, mientras que Prontosan® lo hizo en todas excepto en *K. pneumoniae* ST-716. A las concentraciones comerciales, tanto clorhexidina como Prontosan® mostraron actividad bactericida frente a todas las cepas estudiadas, mejorando el Prontosan® a la clorhexidina frente a *S. aureus*.

Figura 10. Efecto de Prontosan® y clorhexidina (CHX) sobre los recuentos de bacterias viables en biofilms de 1 semana.



*p<0,05 respecto a su control.

#p<0,05 respecto a la misma concentración de clorhexidina.

4. CONCLUSIONES

1. Concentraciones subinhibitorias (0,25xCMI) de Prontosan® y clorhexidina al 2% disminuyen la cantidad o biomasa de biofilm formado por la cepa *E. faecalis* CC2 estudiada, si bien no afectan a la concentración de bacterias viables formadoras de biofilm.
2. A concentraciones subinhibitorias (0,25xCMI) y concentraciones equivalentes a la CMI (1xCMI), tanto clorhexidina al 2% como Prontosan® no mostraron una alta capacidad para disminuir la formación de biofilms maduros ni afectaron significativamente la cantidad de bacterias viables de los biofilms maduros.
3. A concentraciones de uso comercial y tiempos de exposición similares a los utilizados en práctica clínica ambos productos conseguían eliminar los biofilms (biomasa y bacterias viables).
4. Prontosan® obtuvo mayor eficacia que clorhexidina al 2% (particularmente a las 24h y 48h) tanto en la capacidad de erradicar el biofilm maduro como en la actividad bactericida sobre dichos biofilms, llegando en numerosas ocasiones a erradicar por completo a las bacterias viables del mismo.
5. De las cepas estudiadas, los biofilms formados por *K. pneumoniae* ST-716 fueron los más resistentes a la actividad de los biocidas, mientras que los formados por *A. baumannii* ST-2 y *S. aureus* CC5 fueron los más sensibles, incrementándose dicha sensibilidad a medida que aumentaba el tiempo de formación de biofilm.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Document M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute.

2. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria.

Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A.

Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;20(10):981-90. doi: 10.1111/1469-0691.12651. Epub 2014 Jun 14.

3. Exposure of *E. coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure.

Capita R, Riesco-Peláez F, Alonso-Hernando A, Alonso-Calleja C.

Appl Environ Microbiol. 2014 Feb;80(4):1268-80. doi: 10.1128/AEM.02283-13. Epub 2013 Dec 6.