



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



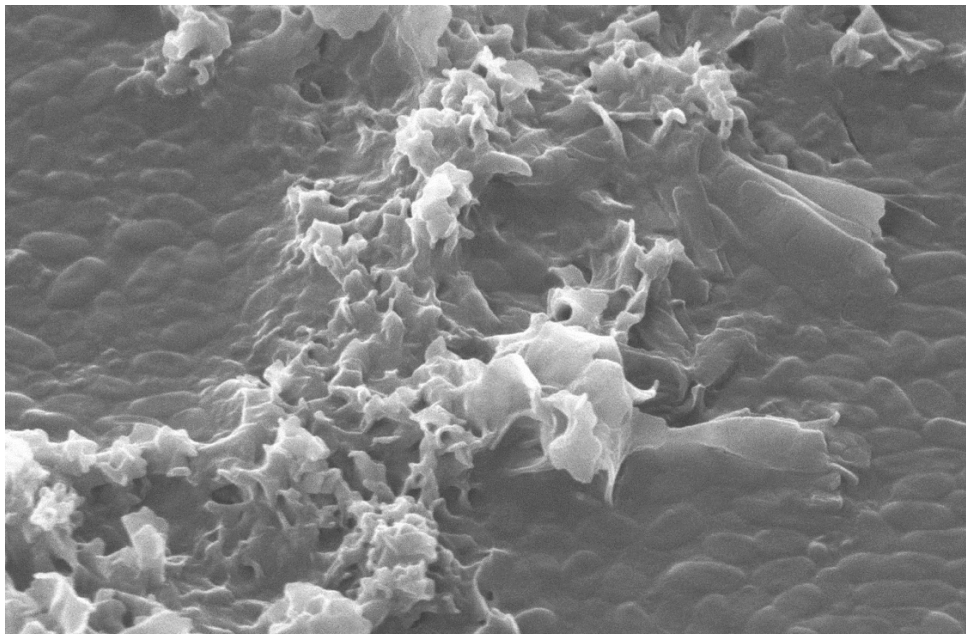
INM

Infection and Immunity

AVALUACIÓ DE LA FORMACIÓ DE BIOFILM I DE LA SUSCEPTIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS DE SOQUES AÏLLADES D'INFECCIONS ASSOCIADES A L'ÚS DE DISPOSITIUS MÈDICS

Irene Juan Simó

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic: Dra. Dania García Sánchez (danialgarcias@urv.cat),
Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental, Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques,.

En cooperació amb: Grup d'Investigació d'Infecció i Immunitat de
l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili.

Supervisor/s: Dra. Anna Rull Aixà (anna.rull@iispv.cat) i Dra. Alba
Sánchez Morillo (alba.sanchez@iispv.cat), grup d'Investigació Infecció i
Immunitat,.

Jo, **Irene Juan Simó**, amb DNI **47479354V**, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV, *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guiaper a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, **2 de Setembre** de 2024

(signatura)

Agraïments

Primerament, m'agradaria agrair l'ajuda, bons consells i el suport imprescindible de la meva tutora de pràctiques la Dra. Alba Sánchez Morillo tant al laboratori com en la redacció del treball, tot l'equip que forma el grup de recerca Infecció i Immunitat de l'IISPV pels seus bons consells i a la Dra. Ana Rull Aixa per donar-me l'oportunitat de realitzar les pràctiques curriculars en aquest grup. També m'agradaria agrair a la Dra. Dania García Sánchez, la meva tutora acadèmica, per les correccions realitzades del treball i per aconsellar-me i guiar-me durant tot el procés.

Agrair de tot cor a la meva família, els meus pares, la meva germana i la meva parella, per la seva confiança dipositada en mi i el seu suport i optimisme incondicional, sense ells no hagués pogut aconseguir els meus objectius, sobretot quan tot pareixia negre.

També agrair a les meves amigues de la facultat, les que seran per sempre. Gràcies per totes les tardes al CRAI de risses i sobretot molt d'estudi, per totes les anècdotes juntes i per la vostra companyia. La complicitat i l'amistat que compartim ens ha permès arribar a la meta, i espero que sempre sigui així. La veritat, no m'imagino la universitat sense vosaltres.

No m'oblido tampoc de les amigues de sempre, les del poble, les que m'han donat suport des de petita, i de gran des de la distància.

ÍNDEX

SIGLES.....	6
1. DADES DEL CENTRE	7
2. RESUM I PARAULES CLAU	8
RESUM	8
PARAULES CLAU	8
1. INTRODUCCIÓ	9
2.1 QUÈ SÓN ELS BIOFILMS?	9
2.2 TÈCNiques PER L'ESTUDI DE BIOFILMS	13
2.3 EL BIOFILM EN HUMANS	14
2.4 IMPACTE I PROBLEMÀTICA DELS BIOFILMS EN DISPOSITIUS MÈDICS.....	15
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS DEL TREBALL	18
3. METODOLOGIA	19
4.1 SOQUES INCLOSES EN L'ESTUDI.....	19
4.2 PREPARACIÓ DE L'INÒCUL, CREIXEMENT EN PLACA I AVALUACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE BIOFILM.....	19
4.3 DETERMINACIÓ DE LA SENSIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS.....	23
4.4 ANÀLISI ESTADÍSTIC	24
RESULTATS	25
6.1 CAPACITAT PRODUCTORA DE BIOFILM.....	26
6.2 AVALUACIÓ DE LA SENSIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS	29
4. DISCUSSIÓ	33
5. CONCLUSIONS	38
6. AVALUACIÓ PERSONAL.....	39
7. BIBLIOGRAFIA	40
8. ANNEXOS	45

SIGLES

- AF: àcid fusídic.
- AMC: amoxicil·lina – àcid clavulànic.
- AMK: amikacina.
- AMP: ampicil·lina.
- AMX: amoxicil·lina.
- ATM: aztreonam.
- CECT: Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus.
- CFM: cefexima.
- CFZ: cefazolina.
- CIP: ciprofloxacina.
- CLI: clindamicina.
- COL: colistina.
- CTX: cefotaxima.
- CV: Cristall Violeta.
- CVC: Catèter Venós Central.
- CXM: cefuroxima.
- DAP: daptomicina.
- DO: Densitat Òptica.
- ECDC: Centre Europeu de la Prevenció i Control.
- eDNA: DNA extracel·lular.
- EPS: polímers extracel·lulars.
- ERI: eritromicina.
- EUCAST: “European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing”.
- ITU: Infecció relacionada amb el Tracte Urinari.
- LVX: levofloxacina.
- LZD: linezolid.
- MCSL: Microscopi Confocal d'Escombra Làser.
- MDR: “Multidrug resistant”: multirresistència.
- MEM: meropenem.
- MRSA: “Methicillin – Resistant *S. aureus*”.
- MSSA: “Methicillin – Sensitive *S. aureus*”.
- MUP: mupirocina.
- NIH: “National Institute of Health”.
- NIT: nitrofurantoïna.
- NOR: norfloxacina.
- OXA: oxacilina.
- PBS: “Phosphate Buffered Saline”.
- PEN: penicil·lina.
- PNAG: poli – N – acetilglucosamina.
- RIF: rifampicina.
- RM: Ressonància Magnètica.
- RMN: Ressonància Magnètica Nuclear.
- SAM: ampicil·lina – sulbactam.
- STH: estreptomicina synergy.
- SXT: trimetoprim – sulfametoxazol.
- SYN: synergy.
- TCY: tetraciclina.
- TEC: teicoplanina.
- TGC: tigeciclina.
- TIC: ticarcilina.
- TOB: trobamicina.
- TSB: “Tryptic Soy Broth”.
- TZP: piperacilina – tazobactam.
- UPEC: soca *E. coli* uropatogènica.
- VAN: vancomicina.

1. DADES DEL CENTRE

Aquest estudi s'ha realitzat a l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), concretament al grup d'Immunitat i Infecció (INIM) en l'estada corresponen a les pràctiques curriculars, des de gener fins maig de 2024.

L'IISPV es tracta d'un centre d'investigació creat al 2005, amb l'objectiu d'integrar la investigació biomèdica al Camp de Tarragona i les Terres de l'Ebre, per a millorar la qualitat de vida dels pacients i la ciutadania en general. En aquest projecte participen diferents hospitals de les dues regions, concretament; l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, com a hospital de referència de la regió, l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i l'Hospital Universitari Institut Pere Mata de Reus, juntament amb la participació de la Universitat Rovira i Virgili.

El grup INIM es tracta d'un grup de recerca especialitzat en l'estudi de malalties infeccioses dirigit per la Dra. Anna Rull Aixa. Tot i que centren la seva activitat en la immunopatogènia del VIH, també tenen altres àrees d'investigació com ara el COVID – 19 i les infeccions nosocomials.

El meu treball ha sigut supervisat per la Dra. Anna Rull Aixa i la Dra. Alba Sánchez Morillo, el qual ha consistit en avaluar la capacitat de formació de biofilm juntament amb la resistència antimicrobiana de soques aïllades d'infeccions associades a l'ús de dispositius mèdics.

Parc Sanitari Joan XXIII
C/ Dr. Mallafrè Guash, 4
Edifici D (Tarragonès)
43005 Tarragona
Telèfon: 977 29 58 00

2. RESUM I PARAULES CLAU

RESUM

Els biofilms són estructures tridimensionals formades per un agregat de microorganismes envoltats per la seva matriu extracel·lular, que els confereix protecció del medi exterior i proporciona un micro-ambient característic i singular pel seu desenvolupament i supervivència. Pels bacteris patògens, la capacitat de formar biofilms és un mecanisme de virulència que els permet desenvolupar estratègies d'evasió del sistema immunitari i de resistència als antibiòtics. Les infeccions provocades per microorganismes formadors de biofilms associats a dispositius mèdics suposen un problema molt greu pel sistema sanitari, ja que l'increment de la resistència als antimicrobians suposa el fracàs terapèutic, seguit de l'ampliació de les estades hospitalàries, comportant un elevat cost econòmic.

En aquest treball s'avaluen 30 soques bacterianes aïllades de diferents dispositius mèdics (catèters, sondes i pròtesis) i infeccions associades a la presència de biofilm. Els dispositius més freqüents són els catèters. El gènere més freqüent Gram-positiu és *Staphylococcus epidermidis*, associat als catèters i les pròtesis, i el més freqüent Gram-negatiu és *Escherichia coli* associat a les sondes i les pròtesis. També es va avaluar la capacitat de formació de biofilm *in-vitro*, i la resistència als antibiòtics d'ús terapèutic de les soques, on s'han classificat en soques no productores, productores febles, productores moderades i productores fortes, i determinar la seva multirresistència. L'organisme *S. epidermidis*, presenta soques no capaces de produir biofilm i altres amb capacitat feble, i totes multirresistents, i l'organisme *E. coli*, presenta soques sense capacitat productora, amb producció feble i moderada, i la meitat de les soques multirresistents.

PARAULES CLAU

Bacterièmia, biofilm, dispositiu mèdic, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, infeccions nosocomials, MRSA, MSSA, multirresistència, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*.

3. INTRODUCCIÓ

3.1 QUÈ SÓN ELS BIOFILMS?

El biofilm es defineix com una estructura tridimensional formada per un agregat de microorganismes (bacteris, protozous, algues, fongs) envoltats per una matriu extracel·lular polimèrica “auto-secretada” i generalment altament hidratada (Flemming i Wuertz, 2019). Els biofilms poden ser monoespecífics o estar constituïts per diferents gèneres i espècies, i poden o no, estar adherits a diferents tipus de superfícies tant biòtiques com abiòtiques (Karygianni et al., 2020). La capacitat de formar aquests tipus d'agregats constitueix una de les principals estratègies d'adaptació dels microorganismes a nínxols amb condicions de vida extremes pel que fa a l'estrès hídric i osmòtic, la pressió, la temperatura, el pH, l'exposició a productes químics (per exemple, biocides i antibiòtics) i, fins i tot, els permet superar condicions d'estrès nutricional (Stewart et al., 2022).

Tot i que els bacteris han estat estudiats tradicionalment en condicions *in-vitro* com a organismes unicel·lulars planctònics, la realitat és que la majoria dels bacteris es troben formant agregats comunitaris en la majoria dels ambients dels ecosistemes terrestres i aquàtics. Els bacteris que formen la microbiota del cos humà no són una excepció. En les últimes dècades s'han trobat biofilms en teixits que fa temps que es sap que alberguen microbiota comensal, on els biofilms es poden trobar com agregats suspesos en el moc o altres secrecions de l'hoste o pel contrari, es poden unir al propi teixit, normalment a una interfície mucosa (Flemming i Wuertz, 2019).

El primer autor que va documentar un biofilm va ser Anthony van Leeuwenhoek (1632–1723), a través de diferents observacions realitzades del material obtingut de la seva pròpia boca, on va observar microorganismes agregats a les "esquerdes de les dents" i a partícules que va raspar de la seva llengua, sent la primera referència al desenvolupament de la placa dental i a les comunitats microbianes normals de la mucosa de la llengua, fets que es van descriure molts anys després pels dentistes. Posteriorment, al segle XIX, Louis Pasteur (1822–1895) també va observar la presència d'agregats bacterians com a causa de l'acidosa adquirida en la fermentació del vi i en les “membranes viscoses” remogudes dels barrils de vinagre conegudes com *mère du vinaigre*.

Durant el següent segle, els microorganismes formadors de biofilms no van despertar interès entre la comunitat científica, eren pràcticament desconeguts per la majoria dels microbiòlegs i en la recerca mèdica. El terme *film* (pel·lícula), fent referència a l'adhesió, l'agregació i la multiplicació bacteriana a les superfícies, es va utilitzar per primera vegada en

microbiologia marina en el 1933, per distingir els bacteris adherits (sèssils) dels bacteris "planctònics" de vida lliure. En medicina, entre 1970 i 1978 es va establir per primera vegada el vincle entre la infecció pulmonar crònica i els agregats bacterians en pacients amb fibrosi quística. La primera imatge d'aquest biofilm va ser publicada a l'any 1977 i va demostrar la presència de *Pseudomonas aeruginosa* formant agregats en l'esput de pacients amb fibrosi quística (Høiby i Axelsen, 1973). Aquest descobriment, va incentivar la investigació sobre la presència d'aquesta estructura en altres parts del cos, identificant-se agregats bacterians en l'oïda mitjana, ferides, el tracte urinari i reproductiu i el sistema cardiovascular entre altres, tots associats amb diferents estats infecciosos o amb malalties com el càncer (Perry i Tan, 2023). Van ser Johanson i el seu equip els primers en evidenciar la presència de biofilms en dispositius mèdics a l'any 1972, fet que ha impulsat els microbiòlegs a fer recerca en aquest camp (Yadav et al., 2019).

Al 1985, Costerton va descriure aquestes agregacions de bacteris, anomenant-les "*biofilm*", i establint una relació entre aquesta estructura i la resistència antimicrobiana, al avaluar la susceptibilitat a diversos fàrmacs de bacteris planctònics i bacteris formadors de biofilm (Høiby, 2017). Aquest fet, juntament amb l'evolució de la microscòpia cap a finals del S.XX, va permetre observar i estudiar els biofilms mono específics i poliespecífics en cel·les de flux, o mitjançant el marcatge de proteïnes amb fluoròfors per visualitzar les mostres al microscopi d'escombrat làser confocal. També es van desenvolupar altres mètodes més senzills per investigar biofilms, per exemple els assajos de tincions amb el tint cristall violeta (Høiby, 2014).

Actualment, es sap que els biofilms es troben en entorns hospitalaris, en l'instrumental clínic, i en dispositius mèdics implantats, on l'agregació de microorganismes adquireix altres connotacions, ja que poden albergar agents patògens causants d'infeccions que provoquen o empitjoren els estats dels pacients amb malalties de base, a més de provocar la cronificació de malalties i ferides degut a l'elevada facilitat d'evasió del sistema immunitari i el desenvolupament de resistència als antibiòtics, el que provoca una disminució de l'eficàcia dels tractaments convencionals. L'evasió del sistema immunitari s'aconsegueix perquè el biofilm suposa un obstacle d'una certa grandària que les cèl·lules immunitàries, com ara els macròfags, no poden fagocitar. També presenta altres sistemes, com ara induir un estat de citotoxicitat als macròfags i aconseguir disminuir la quantitat de citocines alliberades per les cèl·lules immunitàries, evitar el reconeixement dels anticossos i per tant la resposta immunitària, encara que aquests mecanismes difereixen segons els tàxons que formen el biofilm, per exemple, en els biofilms formats per *Pseudomonas aeruginosa*, aquests poden

alliberar ramnolípids a la matriu extracel·lular, que quan es produeix el contacte molècula – cèl·lula del sistema immunitari, indueixen la necrosi d'aquesta (Perry i Tan, 2023).

L'interior del biofilm està condicionat per un microambient característic, on les subpoblacions de bacteris interaccionen entre sí, condicionant el propi procés d'agregació i l'estructura que adquireix el biofilm (Tolker-Nielsen, 2015).

Els bacteris presenten diferents mecanismes que permeten la comunicació entre ells, que depenen de senyals químiques denominades autoinductors, els quals regulen l'expressió gènica bacteriana en un procés conegut com *quorum sensing*. Aquestes senyals varien segons les espècies, alguns bacteris poden reconèixer diferents tipus de molècules i altres són molt més selectives i específiques. El *quorum sensing* li permet a un bacteri coordinar i desenvolupar diferents funcions dins de la colònia, com poden ser: l' esporulació, la bioluminescència, la virulència, la conjugació, la comunicació cèl·lula – cèl·lula, que els permet desencadenar mecanismes de competència o col·laboració i, a més, són essencials per a la formació del biofilm. Per exemple, algunes espècies al detectar el *quorum sensing* d'altres poden millorar els seus factors de virulència, com ara *Burkholderia cepacia* i *P. aeruginosa*, bacteris que de vegades coinfecten els pulmons dels pacients amb fibrosi quística. Experimentalment es va demostrar que *B. cepacia* incrementa la producció de certs factors de virulència com proteases i sideròfors en presència d'autoinductors extracel·lulars produïts per *P. aeruginosa*. Altres assajos *in-vitro* van trobar que *Porphyromonas gingivalis* i *Streptococcus gordonii* utilitzen el mateix autoinductor per formar biofilms mixtes de relació simbiòtica que provoca periodontitis severa per coinfecció.

El desenvolupament del biofilm està controlat per diversos factors com ara són els mecanismes de regulació gènica dels bacteris expressats com a canvis fenotípics (Rather et al., 2021) coneguts com a resposta activa, i les condicions ambientals conegudes com a resposta passiva (Zafer et al., 2024). Els factors de resposta activa també engloben diversos factors de virulència intrínsecs de cada organisme que determinen la capacitat de formació de biofilm, principalment formats per molècules d'adhesió necessàries per a que es doni la interacció substrat – bacteri que inicia la formació del biofilm. Convé destacar que els factors de patogenicitat que condicionen la formació del biofilm també modularan la resposta immunitària en els pacients i la fermesa de l'estructura del biofilm (Karygianni et al., 2020). Alguns dels factors de virulència que participen en la formació del biofilm són els pili tipus IV i V, el flagel, els EPS (substàncies polimèriques extracel·lulars), la càpsula que poden formar algunes espècies, conferint-lis resistència sèrica, i els gens de resistència als antibiòtics, entre altres (Perry i Tan, 2023).

La formació del biofilm es pot resumir en cinc etapes: adhesió, agregació, creixement, maduració i dispersió (**Fig. 1**). En la primera etapa es produeix l'adhesió dels bacteris a una superfície, on a més s'agreguen entre ells per donar lloc a l'etapa de creixement i establiment del biofilm, finalment la colònia s'estableix a la superfície permetent l'excreció dels components que formen el biofilm. Seguidament en l'etapa de maduració, aquesta estructura adquireix una forma de "bolet". Finalment, gràcies a diversos factors com ara la falta de nutrients, que porta a relacions de competició entre els bacteris de l'interior, l'estrès mecànic i les condicions ambientals, es dona la dispersió del biofilm on s'allibera el contingut interior (Jamal et al., 2018; Rather et al., 2021; Sauer et al., 2022; Zafer et al., 2024).

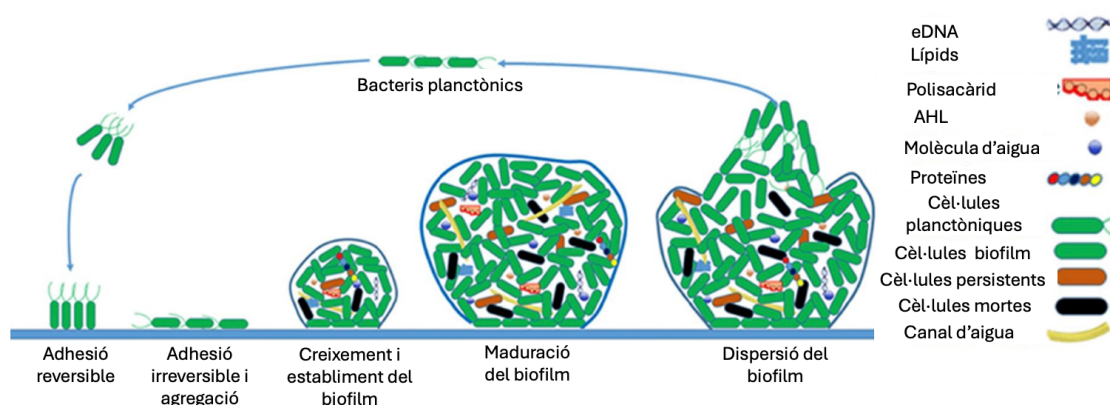


Figura 1. Fases de formació del biofilm: adhesió, agregació, establiment, maduració i dispersió. Modificada de Rather et al., 2021.

Els principals components que constitueixen la matriu del biofilm són substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), les quals participen en la formació d'un microambient químicament favorable a l'interior del biofilm permetent el creixement de les colònies bacterianes (Rather et al., 2021). També confereixen protecció, resistència i consistència a l'estructura (Karygianni et al., 2020).

Tot i que l'estructura i la composició dels EPS varia segons la disponibilitat nutricional, el tipus d'hoste i els tipus d'organismes que formen el biofilm, generalment, els EPS engloben polisacàrids, proteïnes extracel·lulars, DNA i RNA extracel·lular, lípids i molècules surfactants (**Fig. 2**). A més l'aigua de l'interior del biofilm és la responsable de que aquest estigui altament hidratat i contribueix al correcte flux i manteniment dels nutrients (Rather et al., 2021).

Els EPS també es consideren factors de virulència, ja que per a sintetitzar l'estructura del biofilm, els microorganismes han de ser capaços d'alliberar a l'exterior aquestes molècules. A

més, en el cas dels EPS d'estafilococs, com ara eDNA i PNAG (poli-N-acetilglucosamina) participen en la colonització de l'hoste i la resistència antimicrobiana (Karygianni et al., 2020).

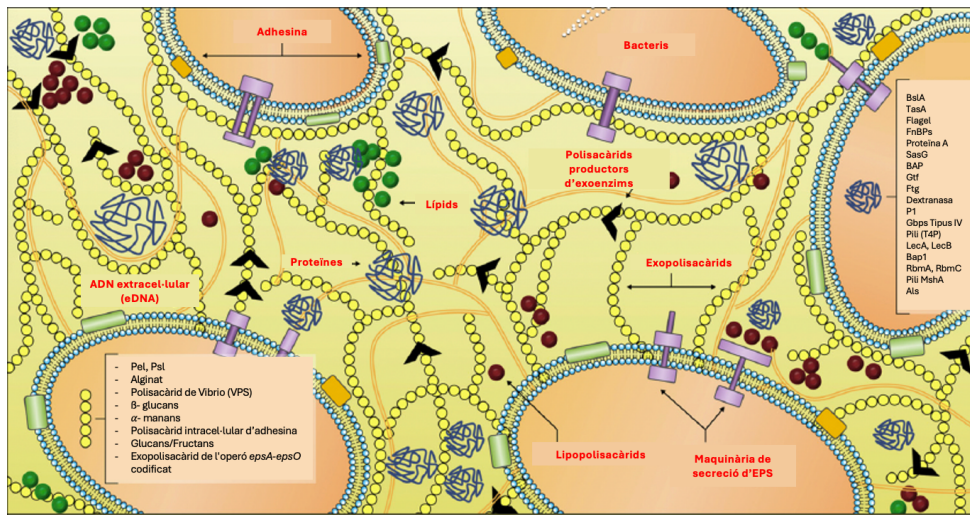


Figura 2. Composició de l'interior del biofilm. Modificada de Karygianni et al. (2020).

3.2 TÈCNiques PER L'ESTUDI DE BIOFILMS

L'estudi dels biofilms requereix d'una recerca interdisciplinària degut a la complexitat estructural i químic-física, necessitant mètodes químics analítics, biològics i d'enginyeria per a poder ser avaluats (Herrling et al., 2019). El seu estudi, és molt important ja que permet conèixer més sobre la seva estructura, composició, naturalesa i ajuda a desenvolupar noves maneres de combatre'l.

Existeixen diverses tècniques per l'avaluació dels biofilms al laboratori, com la ressonància magnètica nuclear (RMN), l'ús de microscopis, per exemple el microscopi òptic, el microscopi confocal d'escombrat làser (MCSL), el microscopi electrònic d'escaneig (SEM), i nous mètodes com la tomografia de coherència òptica, imatges de biofilm multidimensionals i la ressonància magnètica (RM) que és capaç de determinar si els biofilms són produïts per una única espècie (monocultiu) o per varies (biofilm multiespècie) i aporta informació sobre les molècules d'adhesió (Herrling et al., 2019).

Les tècniques emprades en recerca per produir i quantificar *in-vitro* el biofilm són els experiments amb placa de microtitulació juntament amb l'ús d'un tint com el cristall violeta, l'aparell de Robin format per un tub connectat a un corrent de medi continu on es formarà el biofilm, el reactor de flux per goteig, el dispositiu rotatiu de biofilms i el dispositiu de fluids (Azeredo et al., 2017).

La producció i avaluació dels biofilms també es realitza en models animals al laboratori, en organoides de dos dimensions (monocapa) i organoides conservats en un sistema microfluídic, perquè s'ha vist que el tropisme dels bacteris té un paper molt important en la formació de l'estructura (Perry i Tan, 2023).

Tot i que els biofilms s'han estudiat des de moltes dècades amb mètodes rudimentaris, la seva investigació ha evolucionat fins actualment on s'han desenvolupat tècniques innovadores per continuar fent recerca d'aquesta estructura. De cara al futur, és necessari continuar amb aquesta investigació per aprendre a combatre'ls, sobretot en l'àmbit mèdic i hospitalari.

3.3 EL BIOFILM EN CLÍNICA

La primera incidència que es va trobar sobre la presència de biofilms a l'interior del cos humà va ser gràcies a l'anàlisi de mostres de pacients amb fibrosi quística als pulmons. Hui en dia, es sap que els biofilms es poden formar en diferents parts del cos per exemple, l'aparell respiratori, urinari, digestiu, auditiu i cardiovascular, el ossos, l'aparell bucal i les ferides.

El "*National Institute of Health*" (NIH) estima que del 80 % de les infeccions nosocomials, el 65 % estan associades a la presència d'un biofilm (Struelens et al., 2022 b; Jamal et al., 2018). Per exemple, més del 60 % dels pacients amb ferides cròniques sofrirà infeccions relacionades amb la formació de biofilms, suposant un elevat impacte per al sistema sanitari i, juntament amb les implicacions en la salut de la població. (Cercenado et al., 2015).

L'impacte al cos humà dels biofilms implica una disminució de l'eficàcia dels tractaments antibiòtics, l'evasió del sistema immunitari mitjançant diverses estratègies pròpies del biofilm, com ara disminuir la fagocitosi de les cèl·lules del sistema immunitari entre altres, un retràs en la cicatrització de ferides on s'ha vist que la presència de biofilms està relacionada amb la cronificació d'aquestes, i recentment s'ha relacionat la presència dels biofilms en alguns càncers, com ara en el tracte gastrointestinal. Les infeccions cròniques es caracteritzen per la persistència de microorganismes formadors de biofilm que mostren resistència al sistema immunitari del pacient i al tractament administrat (Cercenado et al., 2015). A més, existeix una preferència per part dels bacteris a l'hora de formar el biofilm en els òrgans, com per exemple *P. aeruginosa* al tracte respiratori inferior o *Escherichia coli* provocant infeccions en el tracte urinari (Perry i Tan, 2023).

Els principals bacteris que produeixen aquestes infeccions associades a biofilms són del gènere *Staphylococcus* (*Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus*), *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*), *Escherichia* (*E. coli*) *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), a més a més

de bacteris anaerobis, micobacteris i alguns fongs, com *Candida albicans* (Del Pozo, 2018; Sharma et al., 2019) (**Fig.3**).

En els hospitals, els biofilms no només es poden trobar a l'interior de pacients, sinó també en dispositius mèdics, contribuint al desenvolupament de les infeccions nosocomials.

3.4 IMPACTE I PROBLEMÀTICA DELS BIOFILMS EN DISPOSITIUS MÈDICS

Actualment, en l'àmbit hospitalari s'utilitzen una gran quantitat de dispositius mèdics per tal de tractar malalties. Segons el “*Center for Disease Control and Prevention*” (CDC) s'empren més de 150 milions de catèters vasculars i sobre 5 milions d'implants cada dia (Yadav et al., 2019). Els bacteris procedents d'infeccions nosocomials i del microbioma propi del pacient, tenen la capacitat de sintetitzar biofilms a l'interior d'aquests estris. La seva presència promou el deteriorament i mal funcionament del dispositiu, lligat a greus conseqüències pel pacient, com ara l'extracció del dispositiu o el tractament amb antibiòtics, suposant un elevat cost econòmic per a la societat i el sistema sanitari (Rather et al., 2021).

La capacitat dels microorganismes per sintetitzar biofilms en dispositius mèdics es deu gràcies al material que forma els dispositius, sent majoritàriament, els polímers. Per exemple, en el cas de les lents de contacte, l'adhesió dels microorganismes depèn principalment de la quantitat d'aigua disponible i el tipus de polímer (Jamal et al., 2018). Així doncs, s'ha investigat molt la contaminació dels dispositius, conclouent que les principals causes de contaminació que condicionen la formació de biofilms en els dispositius mèdics són la baixa higiene per part dels practicants, una incorrecta desinfecció de la pell del pacient, l'aigua contaminada i els bacteris suspesos en l'ambient hospitalari (Yadav et al., 2019).

Els dispositius colonitzats per microorganismes capaços de sintetitzar biofilm són els catèters vasculars, les vàlvules cardíaques o marcapassos, les sondes urinàries, les pròtesis articulars i biliars, les lents de contacte, el tub endotraqueal i els implants mamaris (Jamal et al., 2018). Els catèters vasculars són els dispositius mèdics més emprats en pacients. Sols en els Estats Units s'utilitzen 150 milions de catèters per l'administració de fluids intravenosos, medicaments i altres productes com els necessaris per la hemodiàlisi. La colonització dels dispositius pot arribar a provocar bacterièmia en el 30 % dels casos, infecció disseminada que provoca la mort entre el 12–25 % dels pacients. De manera general, s'estima que entre el 15–30 % de les infeccions nosocomials que donen lloc a bacterièmies són provocades per la presència de biofilms en catèters. S'estableix com a bacterièmia el procés pel qual els microorganismes colonitzadors de dispositius mèdics o altres infeccions, aconsegueixen

penetrar al torrent sanguini del pacient, sent capaços de disseminar-se per tot el cos. Tot i que s'han establert estratègies de prevenció, aquestes infeccions depenen del tipus de catèters, el lloc d'inserció, el període de temps a l'interior del pacient i l'experiència del personal mèdic, entre altres (Cercenado et. al, 2015).

La colonització dels dispositius mèdics està condicionada per la mobilitat, localització i la capacitat d'adhesió dels microorganismes. Els biofilms que es formen als dispositius mèdics poden ser, al igual que en la natura, monoespècífics o de multiespècie, fet determinat pel temps de permanència a l'interior del pacient (Jamal et al., 2018). Els principals microorganismes colonitzadors són aquells que provenen de la microbiota del propi pacient, com ara *S. epidermidis*, *E. coli* i *Candida* spp. (Caldara et al., 2022) (Fig.3).

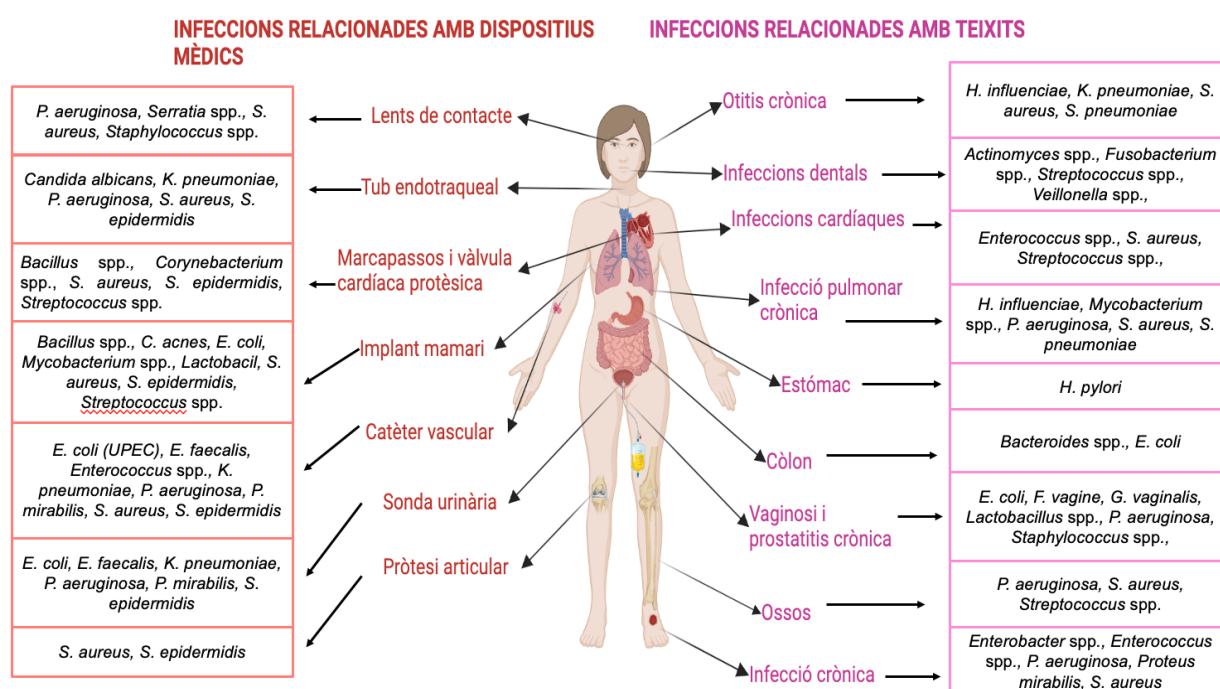


Figura 3. Representació de les principals infeccions associades a dispositius mèdics i les principals infeccions relacionades amb teixits, juntament amb els organismes prevalents en cada infecció i dispositiu mèdic (Caldara et al., 2022; Percival et al., 2015; Perry i Tan, 2023; Special Issue Characteristics of Biofilms on Indwelling Medical Devices, n.d.; Yadav et al., 2019). **Imatge creada amb Biorender.com**

Les infeccions associades a la presència de biofilm en dispositius mèdics es solen tractar amb fàrmacs sintetitzats amb antibiòtics, que poden estar formats per un sol tipus d'antibiòtic o per varius tipus. Tot i que tenen un paper molt important en estadis inicials de la infecció on el biofilm encara no està madur penetrant més quantitat de fàrmac, s'apliquen un conjunt d'antibiòtics de manera preventiva (Del Pozo, 2018). El motiu de la seva administració és per la baixa eficàcia que presenten front aquest tipus d'infeccions, a conseqüència de les resistències desenvolupades pels microorganismes gràcies a la presència de l'estructura del

biofilm, impedit o disminuint l'entrada del fàrmac a l'interior. Existeixen diversos factors que participen en la disminució de la penetració dels fàrmacs a l'interior del biofilm, com ara l'elevada densitat de cèl·lules a l'interior de l'estructura, la funció protectora de la matriu del biofilm, l'estructura 3D del biofilm i la generació de gradients de pH, nutrients, electrons i productes de rebuig que indueixen estrès als bacteris de l'interior provocant l'activació de rutes d'adaptació i mutacions espontànies que els confereixen resistència als antibiòtics.

L'estratègia establerta per combatre aquest tipus d'infeccions, comença per l'extracció física del biofilm, sempre que es pugui, i la posterior aplicació d'un tractament d'antibiòtics. Quan això no és possible, l'eliminació total de la població bacteriana de l'interior de l'estructura no sempre s'aconsegueix, ja que els bacteris persistents són força resistents als antibiòtics de tractament convencional.

Els antibiòtics són molècules químiques amb propietats bactericides o antimicrobianes produïdes per bacteris i fongs (Lima et al., 2020). Poden ser d'origen natural (extret de l'organisme productor) o sintètic (produït al laboratori), per aquest motiu es consideren fàrmacs semi-sintètics (Lima et al., 2020). A meitat de segle XIX, Alexander Fleming va descobrir el primer antibiòtic, la penicil·lina i el seu efecte antibacterià, produïda pel fong *Penicillium notatum*. A l'any 1939, Howard Walter i Ernst Boris van aconseguir obtenir la estructura química de la penicil·lina G, a més d'escalar la seva producció industrial, aconseguint la seva comercialització com a fàrmac (Uddin et al., 2021). No obstant, anys després es van detectar les primeres resistències microbianes, que han augmentat exponencialment al llarg dels anys fins hui en dia, suposant una problemàtica de força major. Existeix una gran varietat d'antibiòtics, classificats en 13 famílies segons la seva estructura química i molecular de qual deriven (**Taula A1** d'annexos) (Ahmed et al., 2017). S'estima que els bacteris associats a un biofilm són entre 100 – 1000 vegades més resistents als antibiòtics respecte als bacteris planctònics (Sharma et al., 2019). Segons les últimes xifres del 2024 del ECDC (Centre Europeu de la Prevenció i Control), la majoria d'infeccions nosocomials s'associen a bacteris súper-resistents (71 %), els quals provoquen al voltant de 90.000 morts per any en la Unió Europea. No obstant, segons el ECDC, el 50 % d'aquestes infeccions es podrien evitar si es realitzaren de forma correcta els protocols de prevenció als hospitals.

4. HIPÒTESI I OBJECTIUS DEL TREBALL

Degut a l'impacte sanitari i econòmic que suposen les infeccions bacterianes, especialment les associades a la formació de biofilms en dispositius mèdics, juntament amb la resistència microbiana, hi ha una elevada necessitat d'investigar en aquest camp. La ECDC estima que en Europa 3,2 milions de pacients han patit una infecció nosocomial provocada tant per infeccions bacterianes en teixits del cos, com les associades a l'existència d'un biofilm en dispositius mèdics, i d'entre ells 37.000 pacients han mort. Els tractaments relacionats amb aquests tipus de infeccions tenen un cost elevat, lo que suposa una càrrega per el sistema sanitari, les dades per l'any 2021 reflecteixen una despesa al voltant dels 10.000 euros per pacient.

Tenint en compte aquesta problemàtica, l'interès i la repercussió de la resistència antimicrobiana en el sistema de salut, el nostre principal objectiu ha estat **estudiar els bacteris aïllats d'infeccions associades a l'ús de diferents dispositius mèdics per determinar la seva capacitat de produir biofilm *in-vitro* i determinar la susceptibilitat *in-vitro* als antibiòtics d'ús més freqüent en clínica**. La hipòtesi d'aquest treball es centra en que l'ambient del biofilm que es forma en els dispositius mèdics propicia el desenvolupament de la resistència als antibiòtics.

Per complir amb l'objectiu principal, i demostrar la hipòtesi establerta, es plantegen els següents objectius secundaris:

- Aïllar i identificar bacteris a partir de dispositius mèdics procedents de pacients amb infeccions relacionades amb l'ús d'aquests dispositius.
- Determinar la capacitat de producció de biofilm *in-vitro* d'aquest microorganismes.
- Determinar la susceptibilitat *in vitro* als antibiòtics d'ús freqüent en clínica de les soques aïllades.
- Correlacionar les dades clíniques i les dades experimentals obtingudes.

5. METODOLOGIA

5.1 SOQUES INCLOSES EN L'ESTUDI

En aquest estudi es van avaluar 30 soques aïllades d'infeccions associades a l'ús de dispositius mèdics, procedents de pacients de l'Hospital Universitari Joan XXIII (HJ23) de Tarragona, processades i liofilitzades pel "Laboratori Clínic ICS, Camp de Tarragona i Terres de l'Ebre" del HJ23 (**Taula 1**). Prèviament, els especialistes del laboratori, van realitzar la tècnica de microdilució per avaluar la resistència i la sensibilitat de les soques als tractaments d'antibiòtics convencionals. La informació de la qual es va partir inclou, el tipus de soca, el dispositiu mèdic de procedència i l'informe de sensibilitat i resistència als antibiòtics.

Les soques es van conservar a -80 °C fins al moment de realitzar els diferents assaigs. La reactivació de les soques es va realitzar en el medi sòlid Agar Sang (bioMérieux SA, França) mitjançant la tècnica de sembra per esgotament amb l'objectiu d'obtenir colònies aïllades. Les plaques van ser incubades per 24 hores a 37 °C (± 2 °C), i a partir de aquests cultius es van preparar els inòculs pels assajos *in-vitro*.

A partir d'aquests cultius també es va generar la col·lecció de soques del treball. Les colònies es van conservar per criocongelació a -80 °C en 500 μ L de medi de cultiu líquid TSB i glicerol (50%).

Les soques controls utilitzades van ser; d'*Escherichia coli* (CECT 943) (control positiu) productora de biofilm i *Staphylococcus epidermidis* (CECT 231) no productora (control negatiu) (Allkja et al., 2020). Les soques van ser adquirides liofilitzades a la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT) de la Universitat de València. El medi líquid TSB es va utilitzar com a blanc.

5.2 PREPARACIÓ DE L'INÒCUL, CREIXEMENT EN PLACA I AVALUACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE BIOFILM

La capacitat productora de biofilm de les soques analitzades es va realitzar mitjançant assaigs fent servir microplaques de 96 pouets, basat en diversos protocols descrits prèviament (Allkja et al., 2020; Coffey i Anderson, 2014; O'Toole, 2010) (**Fig. 4**). Un dels avantatges d'aquest protocol és la seva simplicitat, ja que requereix poc material de laboratori, i es poden avaluar varies mostres en un únic assaig (Coffey i Anderson, 2014).

Taula 1. Soques aïllades i avaluades en aquest estudi.

Espècies bacterianes	Nombre d'aïllats clínics	Fenotip (n)	Dispositius d'on provenen (n)
BACTERIS GRAM-POSITIUS			
<i>Aerococcus urinae</i>	1	-	Sonda orina permanent (1)
<i>Enterococcus faecium</i>	2	-	Catèter venós diàlisi (1)
		-	Sonda orina permanent (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	-	Catèter venós perifèric (1)
		-	Catèter venós diàlisi (1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	MDR (3)	Catèter venós central (3)
		MDR (1)	Catèter venós diàlisi (1)
		MDR (2)	Catèter arterial (2)
		MDR (1)	Catèter venós jugular (1)
		MDR (1)	Pròtesi articular (1)
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	-	Catèter arterial (1)
		-	Catèter Port – a – Cath (1)
BACTERIS GRAM-NEGATIUS			
<i>Citrobacter koseri</i>	2	-	Sonda orina permanent (1)
		-	Pròtesi biliar (1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	-	Catèter venós diàlisi (1)
		-	Catèter arterial (2)
<i>Escherichia coli</i>	4	MDR (1)	Sonda orina permanent (3)
		-	Pròtesi biliar (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	MDR (1)	Catèter arterial (1)
<i>Morganella morganii</i>	1	-	Sonda permanent (1)
<i>Proteus mirabilis</i>	1	MDR (1)	Sonda orina permanent (1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	MDR (1)	Sonda orina permanent (2)
<i>Serratia marcescens</i>	1	MDR (1)	Catèter venós central (1)

Multirresistència (MDR).

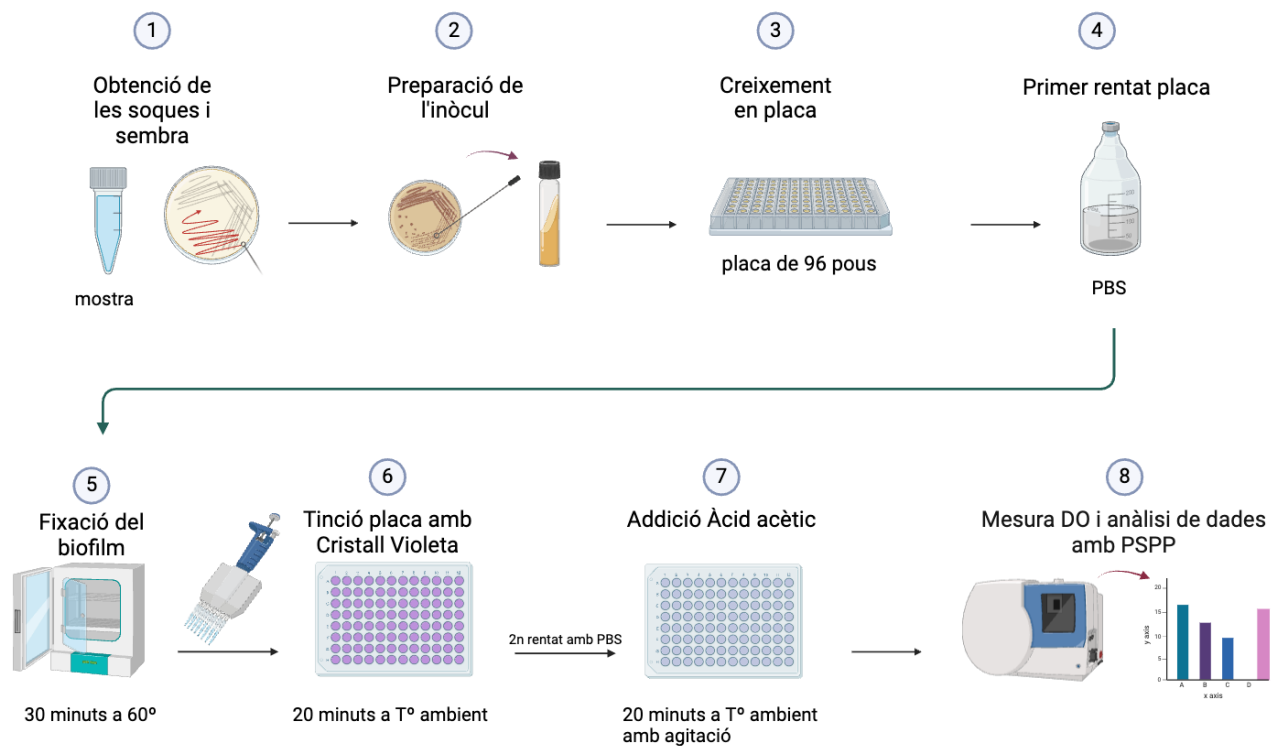


Figura 4. Representació dels diferents passos de la tècnica per avaluar la formació de biofilms (Creada amb BioRender.com).

Es va fer ús tant de medis sòlids com líquids preparats seguint les recomanacions del fabricant. El medi sòlid que es va utilitzar per la obtenció de cultius dels bacteris va ser l'Agar Sang (bioMérieux SA, França) i el medi líquid el TSB (*Tryptic Soy Broth*) (OXOID, Regne Unit) pels assaigs en microplaca. Per preparar el medi líquid TSB es van dipositar 7,5 g en 200 mL d'aigua miliQ. Paral·lelament també es va preparar PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1x, per realitzar els rentats, mitjançant la dissolució d'una pastilla de PBS (Fisher BioReagents, Estats Units) en 200 mL d'aigua miliQ. Finalment, tots els medis de cultiu i dissolucions es van esterilitzar a l'autoclau, durant 20 minuts a una pressió de 1 kg/cm².

Per començar amb el protocol, primerament es va realitzar la preparació dels medis líquids, on es va d'introduir 5 mL de medi líquid TSB a tubs de 10 mL, un per soca problema i blancs. Seguidament, mitjançant un densitòmetre (Biosan, Letonia), es va mesurar la turbolesa de la suspensió cel·lular introduint colònies (una a una) fins obtenir una suspensió bacteriana amb una lectura de 0,5 McFarland. Aquesta quantitat equival a $1,5 \cdot 10^8$ cels/mL aproximadament, per tub. El valor de densitat òptica 0,5 és un valor molt estandarditzat, basat en un procediment molt reproduïble que s'ha establert com el més adequat per a realitzar aquest protocol (Stepanovic et al., 2007).

Es van preparar les dilucions 1:100 en tubs eppendorf amb 396 μ L del medi de cultiu i 4 μ L del inòcul. Després es procedeix amb l'addició de 200 μ L del inòcul a la placa de 96 pouets, i la posterior incubació d'aquesta a 37 °C durant 24 hores (Di Domenico et al., 2016). En cada placa es van avaluar 8 soques. De cada soca es van preparar inòculs per duplicat, i es van avaluar per triplicat cadascun. Els controls es van col·locar per quadruplicat, tant el positiu (formador) com el negatiu (no formador), i els blancs, pouets només amb medi de cultiu (**Fig. 5**).

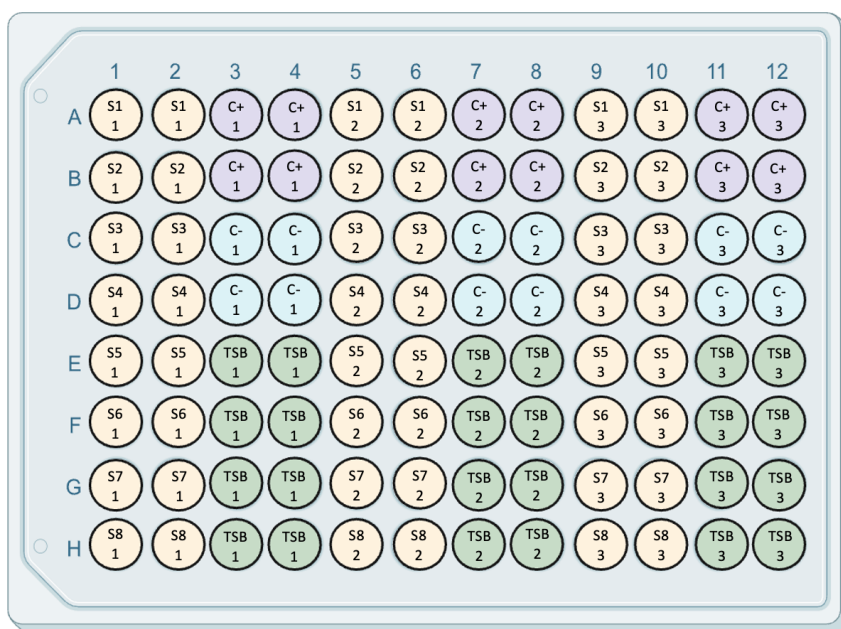


Figura 5. Imatge representativa de la distribució de les soques (S), els controls positiu (C⁺) i negatiu (C⁻) i els blancs (TSB). El número de sota identifica la rèplica (Creada amb BioRender.com)

L'avaluació de la formació biofilm es va a realitzar utilitzant la tinció amb el colorant cristall violeta (CV). La quantificació dels biofilms en els pous es va mesurar amb l'espectrofotòmetre. Aquest procediment es va començar decantant el medi de la placa per eliminar els bacteris lliures en el medi, amb cura de no despendre el biofilm. Seguidament, es van realitzar tres rentats consecutius amb 200 μ L de PBS (Allkja et al., 2020). Es va fixar el biofilm amb calor incubant la placa a 60 °C durant 30 minuts. Després, es va tenyir el biofilm amb CV a 1% i es va incubar a temperatura ambient durant 20 minuts. Es va descartar l'excés de CV. Després, es van realitzar tres rentats de PBS, per poder afegir 200 μ L d'àcid acètic 33% que va solubilitzar el biofilm. Es va incubar la placa a temperatura ambient durant 20 minuts en agitació (O'Toole, 2010; Coffey i Anderson, 2014). Finalment, es va mesurar la densitat òptica (DO) a 570 nm de cada pou mitjançant l'espectrofotòmetre Varioskan Lux (Thermo Scientific, Estats Units) (Di Domenico et al., 2016).

Per a classificar les soques segons el grau de formació de biofilm, es van seguir els següents criteris on es va comparar les densitats òptiques (DO) obtingudes per cada soca amb la del control negatiu (DOc) (Di Domenico et al., 2016; Stepanovic et al., 2007):

- **SOCA NO FORMADORA** → $DO \leq DOc$: la DO de la mostra és més petita que la DO del control negatiu.
- **SOCA FORMADORA FEBLE** → $DOc < DO \leq 2 * DOc$: la DO de la soca és més gran que la DO del control negatiu, però menor o igual que la DO del control negatiu multiplicat per dos.
- **SOCA FORMADORA MODERADA** → $2 * DOc < DO \leq 4 * DOc$: el valor de la DO de la soca és major que el doble del valor del control negatiu, però és menor que el quàdruple del valor del control negatiu.
- **SOCA FORMADORA FORTA** → $DO > 4 * DOc$: el valor de la soca és major que el quàdruple del valor del control negatiu.

5.3 DETERMINACIÓ DE LA SENSIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS

Les probes de susceptibilitat dels microorganismes als antibiòtics van permetre conèixer si els microorganismes són resistents o no enfront a certs antibiòtics en condicions *in-vitro* (Cercenado et al., 2015).

La resistència a antibiòtics de cada soca es va avaluar amb la tècnica de microdilució (MicroScan WalkAway plus, Beckman – Coulter®, CA, EUA) seguint les recomanacions de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) al laboratori Clínic ICS Camp de Tarragona del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (HJ23). La tècnica de microdilució és una tècnica rutinària d'avaluació de la resistència dels microorganismes als antibiòtics. Consisteix en el creixement microbià de la soca d'interès en un medi líquid que conté diferents concentracions dels antibiòtics (March-Rosselló, 2017).

Els antibiòtics avaluats són els fàrmacs més comuns per tractar infeccions bacterianes, tant associades a biofilms com no (**Taula 2**). També es va determinar la multiresistència, referint-se a la resistència d'almenys un dels antibiòtic de tres o més famílies d'antibiòtics (Cercenado et al. , 2015).

5.4 ANÀLISI ESTADÍSTIC

El tractament de dades dels valors de l'absorbància, consisteix en:

- 1- Eliminació dels “*outliers*” (valors que difereixen significativament dels altres).
- 2- Càlcul de la mitjana dels duplicats.
- 3- Càlcul de la mitjana dels triplicats.
- 4- Càlcul de la desviació estàndard.

L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el programa IBM PSPPIRE *Statistics* versió PSPP-1.4.1-2.dgm, el qual ha permès realitzar l'anàlisi de taules creuades mitjançant el test *chi Square* (X^2), i obtenir les freqüències dels resultats obtinguts. Els valors de $p \leq 0,05$ es van considerar estadísticament significatius.

Taula 2. Antibiótics utilitzats per probes de susceptibilitat *in-vitro*.

Família	Antibiòtic
Aminoglucòsids	Ciprofloxacina, estreptomina synergy, gentamicina synergy, levofloxacina i norfloxacina.
Betalactàmics	Ampicil·lina, amoxicil·lina, amoxicil·lina – àcid clavulànic, aztreonam, cefepima, cefixima, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima cefuroxima, ertapenem, imipenem, meropenem, oxacil·lina, penicil·lina, piperacil·lina – tazobactam, tetraciclina i ticarcil·lina.
Glucopèptids	Amikacina, gentamicina i tobramicina.
Lincosamides	Teicoplanina i vancomicina.
Macròlids	Eritromicina
Oxazolidinona	Tetraciclina i tigeciclina.
Quinolones	Clindamicina i syercyd.
Sulfonamida	Linezolid.
Tetraciclina	Trimetoprim – sulfametoxazol.
Altres	Àcid fusídic, colistina, daptomicina, fosfomicina, mupirocina, nitrofurantoïna i rifampicina.

6. RESULTATS

Es van avaluar 30 soques procedents de diferents dispositius mèdics, de les quals el 50% són Gram-positives i l'altra meitat són Gram-negatives.

Les 30 soques avaluades van ser identificades com *A. urinae* (n=1; 3 %), *C. koseri* (n=2; 7 %), *E. cloacae* (n=3; 10 %), *E. coli* (n=4; 13 %), *E. faecium* (n=2; 7 %), *K. pneumoniae* (n=1; 3 %), *M. morganii* (n=1; 3 %), *P. aeruginosa* (n=2; 7 %), *P. mirabilis* (n=1; 3 %), *S. aureus* (n=2; 7 %), *S. epidermidis* (n=8; 27 %), *S. hominis* (n=2; 7 %) i *S. marcescens* (n=1; 3 %) (**Fig. 6 i Annexos**).

L'organisme identificat amb major freqüència en aquest treball és *S. epidermidis* (27 %) (Gram-positiu) seguit d' *E. coli* (13 %) i *E. cloacae* (10 %)(Gram-negatius).

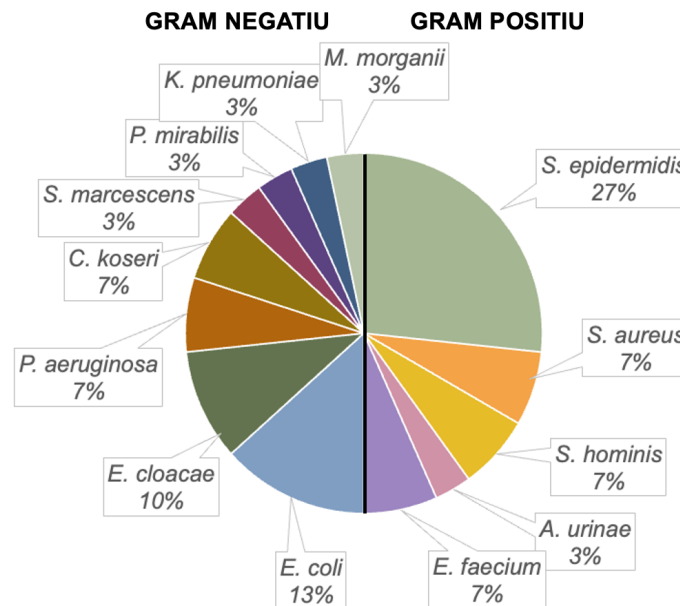


Figura 6. Distribució de les soques aïllades segons l'espècie bacteriana.

La **Figura 7a**, representa els dispositius dels quals procedeixen les soques estudiades, on més de la meitat (n=17; 53,1 %) provenen de catèters, un 31,3 % (n=10) provenen de sondes i també de pròtesis (n=3; 9,4 %), on es pot observar que els dispositius d'on es van aïllar més soques van ser els catèters. En la **Figura 7b**, es poden observar les espècies identificades en els diferents dispositius. Respecte a les espècies que s'han aïllat dels diferents tipus de catèters, es pot observar una gran prevalença de *S. epidermidis* (n=7; 41 %), seguida d'altres organismes com ara *E. cloacae* (n=3; 17 %), *S. aureus* (n=2; 12 %) i *S. hominis* (n=2; 12 %). Les espècies amb menor prevalença van ser *E. faecium* (n=1; 6 %), *K. pneumoniae* (n=1; 6 %) i *S. marcescens* (n=1; 6 %).

Quant a les diferents soques aïllades de sondes, es pot observar que *E. coli* (n=3; 30 %) és l'espècie amb una major representativitat, seguida de *P. aeruginosa* (n=2; 20 %). Finalment, també es troben presents altres espècies com ara *M. morgani* (n=1; 10 %), *A. urinae* (n=1; 10 %), *P. mirabilis* (n=1; 10 %), *C. koseri* (n=1; 10 %) i *E. faecium* (n=1; 10 %).

Amb referència a les pròtesis, les principals espècies que es van aïllar d'aquest tipus de dispositiu mèdic són *S. epidermidis* (n=1; 33 %) procedent d'una pròtesi articular, *E. coli* (n=1, 34 %) i *C. koseri* (n=1; 33 %) procedents d'una infecció provocada per un biofilm de multiespècie, però avaluada per separat (mateix pacient). Aquestes també es van aïllar de catèters i sondes. Per tant, no hi ha cap soca exclusiva avaluada procedent de pròtesis. Existeix certa prevalença d'aïllament de les espècies bacterianes en els dispositius mèdics (**Fig. 7b**).

L'espècie *S. epidermidis* no s'ha trobat en sondes, sinó només en catèters i pròtesis. El mateix passa amb *E. coli* i *C. koseri*, les quals procedeixen de pròtesi i sondes, en aquest estudi. També hi ha altres organismes, com *E. faecium*, aïllats de catèters i pròtesis que no es troben en sondes. Com es pot veure en la **Figura 7b**, no s'ha treballat amb cap soca que es trobi en els tres dispositius.

Es van avaluar també els organismes dels diferents tipus de catèters (**Fig. 7e**), on el més comú entre els diferents catèters és *S. epidermidis*, el catèter venós central (n=3), el catèter venós diàlisi (n=1), el catèter venós jugular (n=1) i el catèter arterial (n=2). El segueixen *S. hominis*, al catèter Port – a – Cath (n=1) i al catèter arterial (n=1), i *S. aureus* al catèter venós perifèric (n=1) i al catèter venós diàlisi (n=1).

Existeixen diferències significatives (p-valor = 0,033) entre el tipus de bacteris Gram negatius/Gram-positius i el dispositiu del qual s'han aïllat. Com es pot observar en la **Figura 7c** no hi ha cap organisme Gram-positiu que sigui comú entre les pròtesis i les sondes. En la **Figura 7d** tampoc hi ha cap organisme comú Gram-negatiu entre les pròtesis i els catèters. Per contra, no es va trobar significança entre els bacteris i els tipus de dispositiu (p-valor = 0,152).

6.1 CAPACITAT PRODUCTORA DE BIOFILM

Es va determinar la capacitat productora de les soques, classificant-les segons si són productores o no de biofilm, i si tenen una producció feble, moderada o forta.

Així doncs, com es pot veure en la **Figura 8**, es van obtenir 11 soques (30 %) no productores de biofilm, 12 de les soques (40 %) van ser productores febles, 4 soques (13 %) amb producció moderada i 5 soques (17 %) amb producció forta.

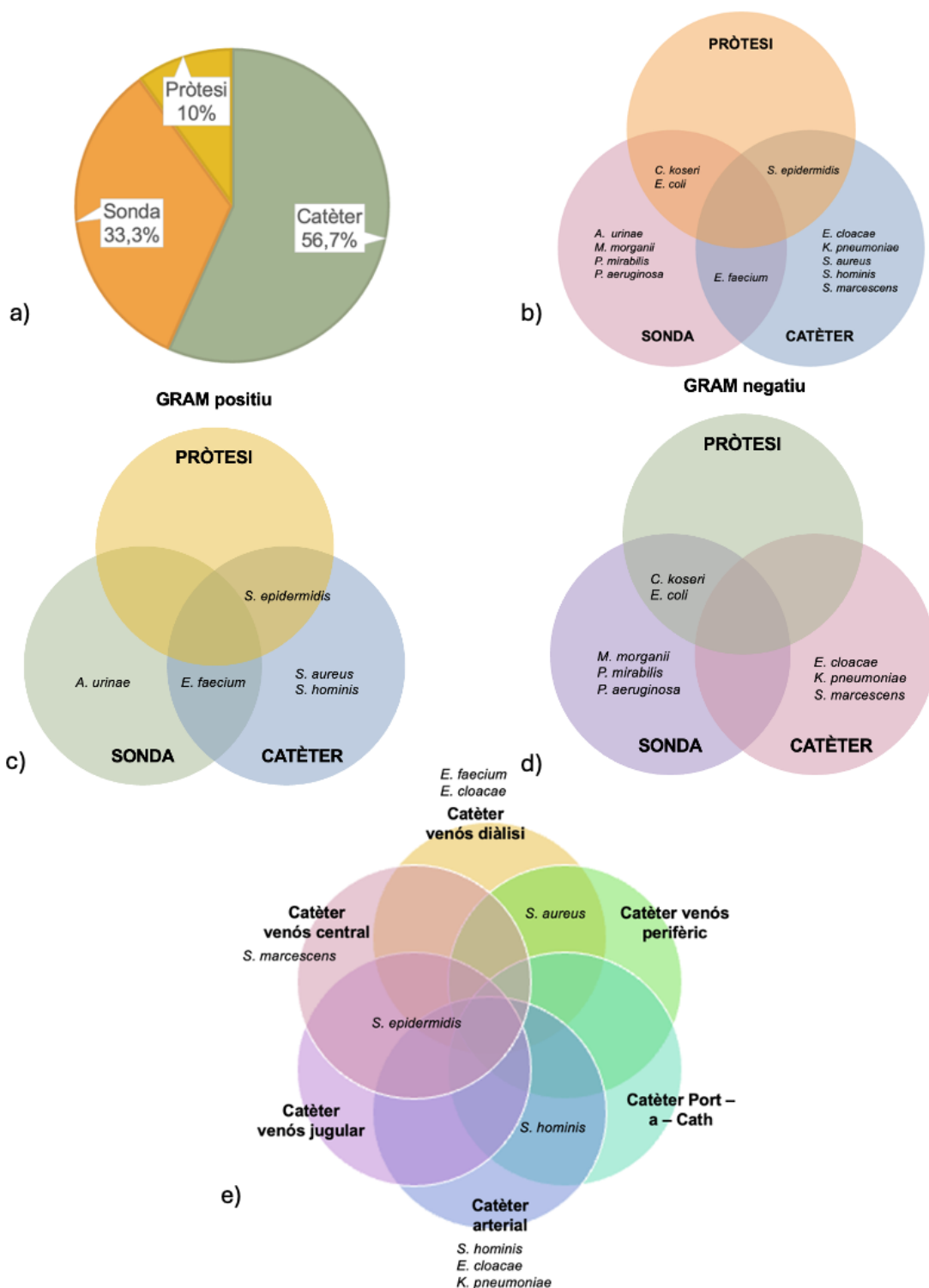


Figura 7. a) Percentatge de soques segons el dispositiu mèdic del qual s'ha aïllat. b) Distribució de espècies segons el dispositiu mèdic. c) Distribució de les espècies segons els diferents tipus de catèters. d) Distribució de les espècies Gram-positives segons els dispositius mèdics dels quals s'han aïllat. e) Distribució de les espècies Gram-negatives segons els dispositius mèdics dels quals s'han aïllat.

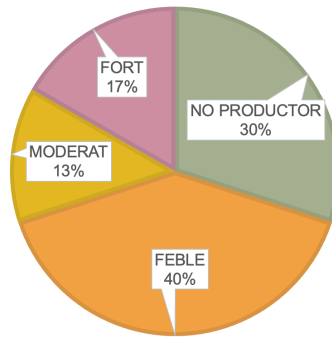


Figura 8. Representació dels percentatges de soques no productores, productores febles, productores moderades i productores fortes.

S'afirma que hi ha una major quantitat de soques amb producció feble (n=12) i no productores (n=11) avaluades.

En la **Figura 9** es pot observar la capacitat productora de biofilm de cada espècie bacteriana, classificada segons si és Gram-positiva o Gram-negativa. Respecte el grup de bacteris Gram-positius, l'organisme *S. epidermidis*, presenta una producció de biofilm feble (n=5; 62,5 %) i sense capacitat productora (n=3; 37,5 %), *S. aureus* presenta tant producció moderada (n=1; 50 %) com producció feble (n=1; 50 %), *S. hominis* presenta una soca no productora de biofilm (n=1; 50 %) i una soca amb producció feble (n=1; 50 %), *E. faecium* presenta una soca de producció forta (n=1; 50 %) i una soca de producció feble (n=1; 50 %), i *A. urinae* té una producció feble (n=1; 100 %).

D'altra banda, en referència al grup dels bacteris Gram-negatius, les soques de *P. aeruginosa* presenten una producció forta (n=2; 100 %). *E. cloacae* presenten tant producció feble (n=1; 33,3 %) com soques que no són capaces de produir biofilm (n=2; 67 %). *E. coli* presenta soques amb producció moderada (n=2; 50 %), amb producció forta (n=1; 25 %) i sense producció (n=1; 25 %), i *C. koseri* presenta producció forta (n=1; 50 %) i producció moderada (n=1; 50 %). De *Klebsiella pneumoniae* només es va avaluar una soca que no era capaç de produir biofilm (n=1; 100 %), al igual que *M. morgani* (n=1; 100 %) i *S. marcescens* (n=1; 100%) amb una soca amb producció feble. Finalment, la soca de *P. mirabilis*, sense capacitat productora de biofilm (n=1; 100 %).

Sense deixar de banda els resultats anteriors, cal remarcar que, excepte l'organisme *E. faecium* que presenta una soca de producció forta i *S. aureus* amb una soca de producció moderada, generalment els organismes Gram-positius tenen una producció feble o són no productors. En canvi, en el grup dels Gram-negatius hi ha més variabilitat en la capacitat de productora de biofilm entre les soques avaluades, respecte l'altre grup *in-vitro*.

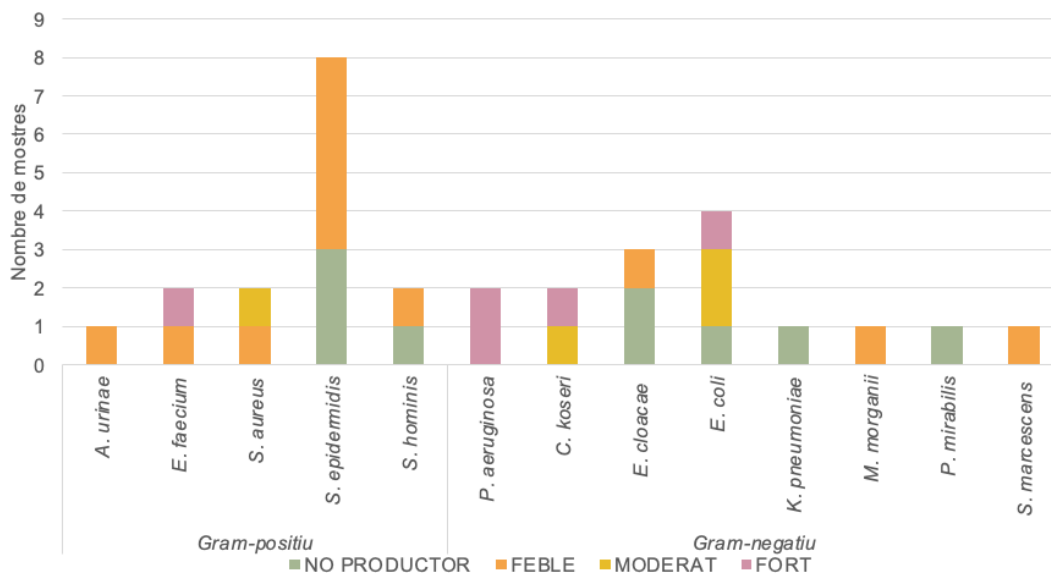


Figura 9. Capacitat productora de biofilm de les espècies avaluades en aquest treball.

Així doncs, en la **Figura 9** es pot observar que hi ha una clara tendència en la producció feble de biofilm en els bacteris Gram-positius ($p = 0,025$). També hi ha una predominança de soques amb producció forta al grup de bacteris Gram-negatius. No obstant, aquesta és l'única tendència, ja que les diferents correlacions realitzades, comparant el tipus de Gram i els diferents tipus de capacitat de producció de biofilm de cada organisme no són significatives ($p\text{-valor} > 0,05$).

6.2 AVALUACIÓ DE LA SENSIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS

Es va realitzar l'avaluació de la susceptibilitat als antibiòtics obtinguts de cada soca, mitjançant el mètode de microdilució. Com es pot observar de forma global en la **Figura 10**, les soques presenten major sensibilitat front a la gentamicina (GEN) amb una eficàcia del 65,6 %, i per contra, aquestes presenten més resistència a l'amikacina (AMK) amb un 46,8 %, sent el fàrmac menys eficaç.

No obstant, cal ressaltar (**Fig. 11**) que la majoria de soques avaluades, tant Gram-positives com Gram-negatives presenten resistència en front a l'antibiòtic amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC), principalment *S. epidermidis* (Penicil·lina (PEN): $n=8$, amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC): $n=8$, oxacil·lina (OXA) $n=8$, ciprofloxacina (CIP): $n=7$, levofloxacina (LVX): $n=7$, amikacina (AMK): $n=5$, gentamicina (GEN): $n=7$, tobramicina (TOB): $n=7$, teicoplanina (TEC): $n=1$, eritromicina (ERI): $n=8$, tetraciclina (TCY): $n=1$, clindamicina (CLI): $n=7$, trimetoprim – sulfametoxazol (SXT): $n=5$ i mupirocina (MUP): $n=8$) que com es pot observar, és resistent a

més de la meitat d'antibiòtics analitzats. També *E. cloacae* (ampicil·lina (AMP): n=3, amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC): n=3, piperacil·lina – tazobactam (TZP): n=3, aztreonam (ATM): n=3, cefoxitina (FOX): n=3, cefotaxima (CTX): n=3, ceftazidima (CAZ): n=3, cefepima (FEP): n=2 i ertapenem (ETP): n=2), que resistent sobretot a antibiòtics de la família dels betalactàmics, i altres soques com ara d'*E. coli* (ampicil·lina (AMP): n=2, amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC): n=1, ciprofloxacina (CIP): n=2, norfloxacina (NOR): n=2 i trimetoprim – sulfametoxazol (STX): n=2), *S. hominis* (penicil·lina (PEN): n=1, amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC): n=1, oxacil·lina (OXA): n=1 i àcid fusídic (AF): n=2), *S. marcescens* (ampicil·lina (AMP): n=1, amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC): n=1, cefuroxima (CXM): n=1, cefoxitina (FOX): n=1 i colistina (COL): n=1) i *M. morgani* (amoxicil·lina – àcid clavulànic (AMC): n=1, ciprofloxacina (CIP): n=1, colistina (COL): n=1 i ampicil·lina – sulbactam (SAM): n=1), resistents a diferents tipus d'antibiòtics.

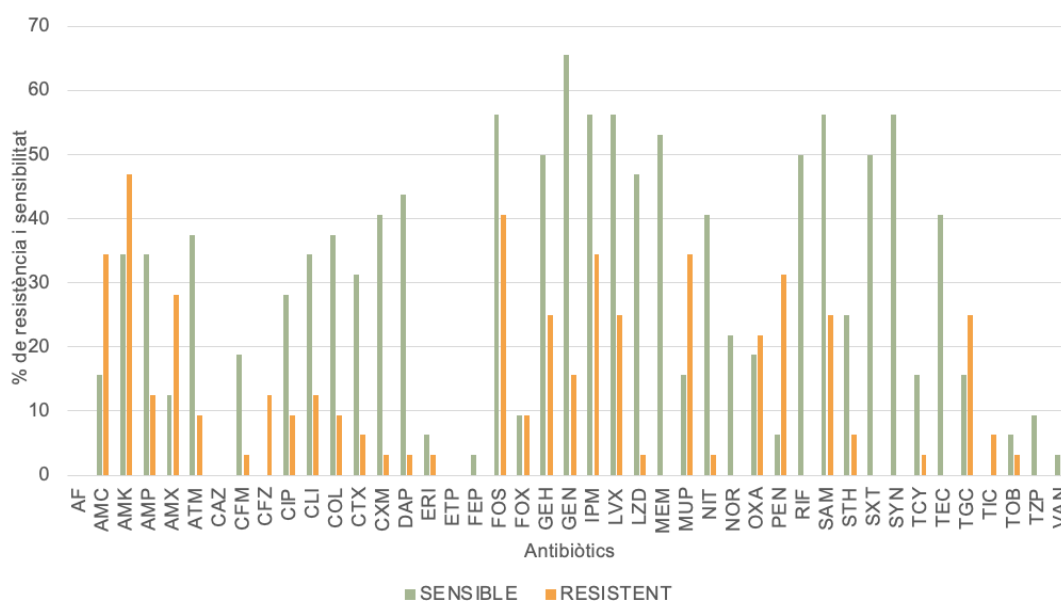


Figura 10. Representació de la susceptibilitat i la resistència de les mostres analitzades a diferents antibiòtics. AF (àcid fusídic), AMC (amoxicilina – àcid clavulànic), AMK (amikacina), AMP (ampicilina), AMX (amoxicilina), ATM (aztreonam), CAZ (ceftazidima), CFM (cefixima), CFZ (cefazolina), CIP (ciprofloxacina), CLI (clindamicina), COL (colistina), CTX (cefotaxima), CXM (cefuroxima), DAP (daptomicina), ERI (eritromicina), ETP (ertapenem), FEP (cefepima), FOS (fosfomicina), FOX (cefotaxima), GEH (gentamicina synergy), GEN (gentamicina), IPM (imipenem), LVX (levofloxacina), LZD (linezolid), MEM (meropenem), MUP (mupirocina), NIT (nitrofurantoïna), NOR (norfloxacina), OXA (oxacil·lina), PEN (penicil·lina), RIF (rifampicina), SAM (ampicil·lina – sulbactam), STH (estreptomocina synergy), SXT (trimetoprim - sulfametoxazol), SYN (synergy), TCY (tetraciclina), TEC (teicoplanina), TGC (tigeciclina), TIC (ticarcilina), TOB (tobramicina), TZP (piperacilina – tazobactam) i VAN (vancomicina).

Per altra banda, la penicil·lina (PEN), a l'igual que l'anterior antibiòtic, no presenta cap efecte antibacterià front una gran quantitat de soques de *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. aureus* i *S. hominis*), i una soca de *M. morgani*.

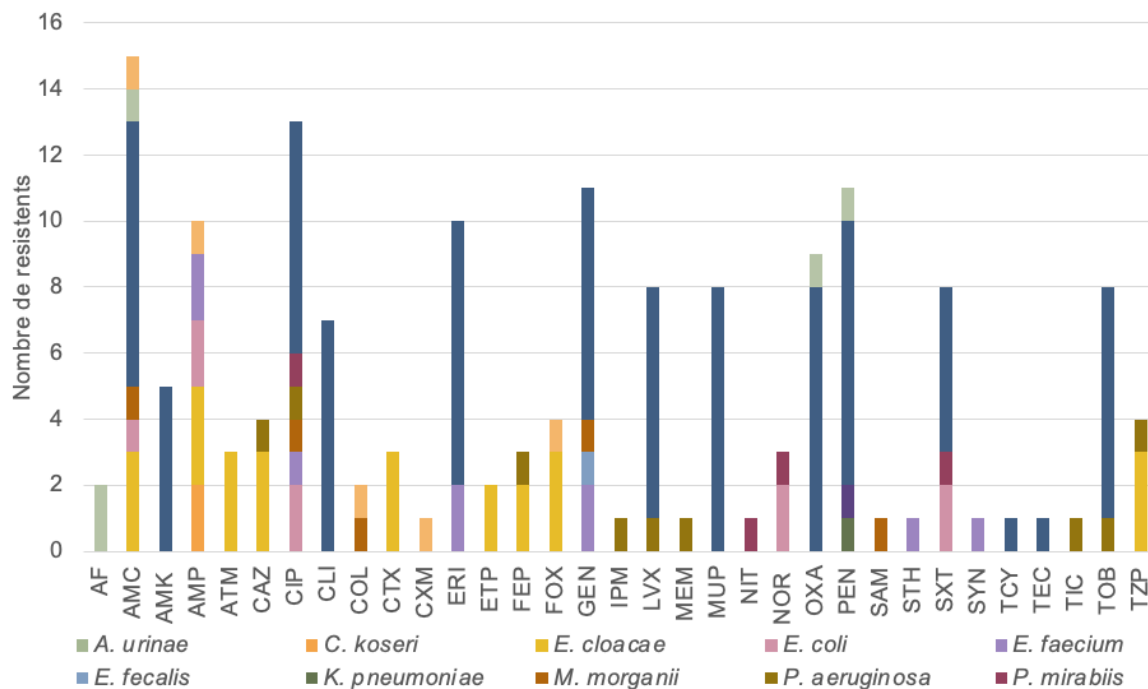


Figura 11. Avaluació de la resistència de les soques avaluades de diversos antibiòtics, AF (àcid fusídric), AMC (amoxicilina – àcid clavulànic), AMK (amikacina), AMP (ampicil·lina), ATM (aztreonam), CAZ (ceftazidima), CIP (ciprofloxacina), CLI (clindamicina), COL (colistina), CTX (cefotaxima), CXM (cefuroxima), ERI (eritromicina), ETP (ertapenem), FEP (cefepima), FOX (cefexitina), GEN (gentamicina), IPM (imipenem), LVX (levofloxacina), MEM (meropenem), MUP (mupirocina), NIT (nitrofurantoïna), NOR (norfloxacina), OXA (oxacil·lina), PEN (penicil·lina), SAM (ampicil·lina – sulbactam), STH (estreptomicina synergy), SXT (trimetoprim - sulfametoxazol), SYN (synergy), TCY (tetraciclina), TEC (teicoplanina), TIC (ticarcilina), TOB (tobramicina) i TZP (piperacil·lina – tazobactam) (Amr-Santa-Cruz-Siglas, n.d.).

Cal considerar també la ciprofloxacina (CIP), on sobretot les soques de *S. epidermidis* són resistents i també altres d'*E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *P. mirabilis* i *M. morgani*, però amb menys freqüència. L'antibiòtic gentamicina (GEN), no presenta efecte terapèutic enfront organismes Gram-positius, concretament *S. epidermidis*, *E. faecium* i *E. faecalis* i una soca Gram-negativa, *M. morgani*.

Finalment també es pot observar que els organismes Gram-negatius, com ara *E. coli*, *E. cloacae*, *C. koseri* i *S. marcescens*, i una soca d'*E. faecium*, són resistents a l'ampicil·lina (AMP).

Per tant, es pot considerar que, la majoria de soques Gram-positives presenten un major percentatge de resistència als antibiòtics avaluats respecte els Gram-negatius, i que *S. epidermidis* (Gram-positiu) és l'organisme que presenta més resistències als antibiòtics avaluats.

Seguidament, es va realitzar la determinació de les soques multiresistents, terme que s'atribueix a qualsevol soca que sigui resistents com a mínim a un antibiòtic de tres o més famílies (Cercenado et al., 2015). Com es pot observar en la **Figura 12**, es pot destacar dels bacteris Gram-positius, *S. epidermidis* (n=7) com a organisme amb més soques

multirresistents. En canvi, dels organismes Gram-negatius, es pot destacar principalment *E. coli* i *E. cloacae* amb dos soques multirresistents, respectivament.

En aquest estudi, les soques multirresistents representen el 40,6% del total (n=13), front un 59,4% (n=19) de soques no multirresistents, fet que es justifica amb la correlació significativa entre el tipus d'organisme i la multirresistència que presenta (p-valor = 0,034).

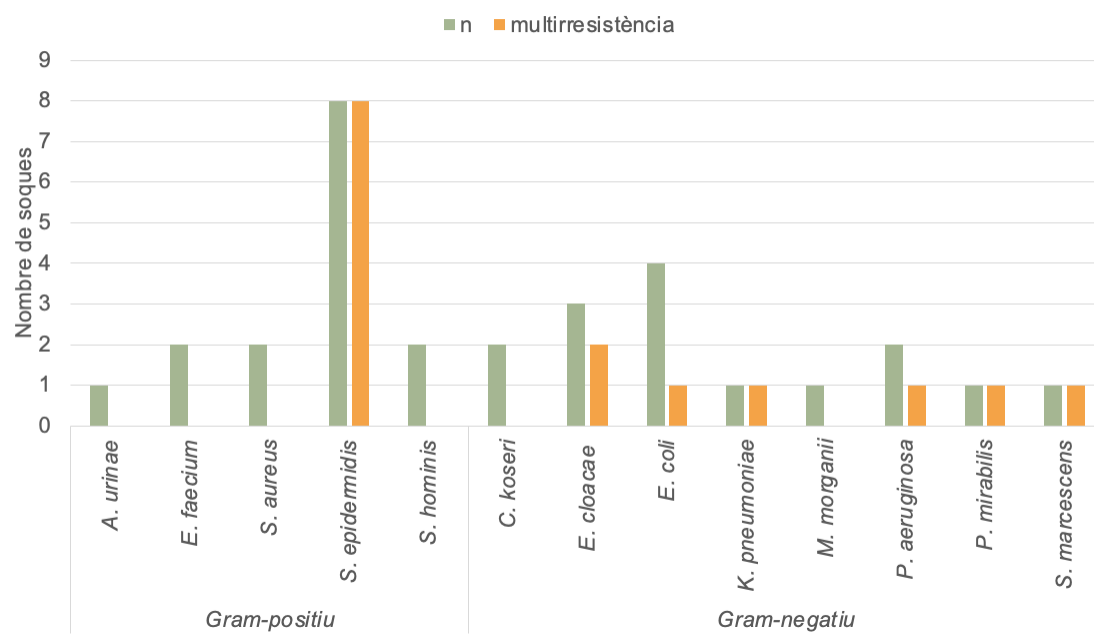


Figura 12. Multirresistència de soques aïllades d'infeccions associades a l'ús de dispositius mèdics. S'indica el nombre total de soques amb color verd i el nombre total de soques multirresistents amb color taronja.

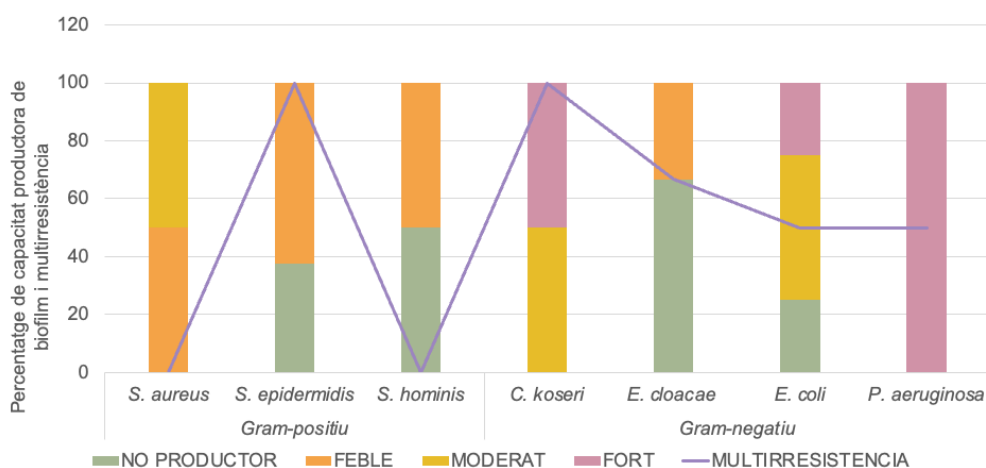


Figura 13. Relació entre la capacitat productora de biofilm i la multirresistència de les soques analitzades. Les barres representen el percentatge de la capacitat de producció de biofilm de cada soca. En verd: no producció de biofilm; en taronja: producció feble; en groc: producció moderada; i en rosa: producció forta. Les línies de color lila representen el percentatge de multirresistència de cada soca.

Finalment, es va estudiar la relació entre la capacitat productora de biofilm i la multirresistència de les soques, representada en la **Figura 13**. Per els organismes Gram-positius, les soques estudiades de *S. epidermidis*, tenen producció feble o no producció de biofilm, i presenten un percentatge elevat de multirresistència, concretament un 100 %, i dels organismes Gram-negatius estudiats, *E. coli* presenta una producció moderada, forta i algunes soques no presenten producció, amb un percentatge de multirresistència del 50 %.

7. DISCUSSIÓ

Actualment una gran part de les infeccions nosocomials s'associen a la presència d'un biofilm, tant en dispositius mèdics com teixits humans. En l'àmbit hospitalari els biofilms s'associen a infeccions persistents, les quals no responen de forma eficaç als tractaments amb antibiòtics convencionals. Per aquest motiu, aquest treball es va centrar en l'avaluació de la capacitat productora de biofilm i la resistència antimicrobiana de 30 soques procedents d'infeccions associades a l'ús de dispositius mèdics, especialment els catèters, les sondes urinàries i les pròtesis.

Tot i que, es va avaluar la mateixa quantitat de soques Gram-positives i Gram-negatives, la variabilitat és baixa, ja que més de la meitat de soques Gram-positives pertanyen a *S. epidermidis*, fet que coincideix amb les dades que exposa Percival et al. (2015), on descriu que el 80 % de les infeccions associades a materials hospitalaris són provocades per *S. epidermidis*. A més, segons Percival et al. (2015), *S. aureus* i *S. epidermidis* són els dos microorganismes del gènere *Staphylococcus* majorment relacionats amb la formació de biofilms en dispositius mèdics, gràcies a l'elevada facilitat a l'hora d'adherir-se a superfícies per formar biofilms (Socohou et al., 2020). Respecte els organismes aïllats Gram-negatius, *E. coli* és el de major freqüència en aquest treball. La prevalença d'aquesta espècie coincideix amb el reportat per altres autors (Yadav et al., 2019), afirmant que tant *E. coli* com *S. epidermidis* juguen un paper molt important en les infeccions produïdes en dispositius mèdics. No obstant, segons Percival et al. (2015), també són molt comuns *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*, aïllades en aquest treball, però amb menor freqüència.

En aquest estudi, més de la meitat de les soques procedeixen d'infeccions produïdes per microorganismes relacionats amb catèters, seguit de les sondes i amb menor freqüència, les pròtesis. Les pròtesis no presenten organismes propis formadors de biofilms, fet que pot ser degut al baix nombre de soques analitzades. La classificació de les soques analitzades segons si són Gram-positives o Gram-negatives presenta una correlació significativa amb el tipus de

bacteris i el dispositiu del qual s'aïllen. Segons Jamal et al., (2018), la part del dispositiu on s'adhereixen els bacteris és molt important, ja que els bacteris Gram-positius i Gram-negatius presenten diferents preferències donades pels factors de virulència intrínsecs de cada organisme que els permet formar biofilm a les parets dels dispositius (Caldara et al., 2022). A més, el microambient format a l'interior del dispositiu mèdic propicia la formació de biofilm, fet demostrat en l'estudi realitzat per Fernández-Barat et al. (2018) sobre MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) en tubs endotraqueals. Els organismes Gram-negatius, com ara *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*, tenen més tendència en trobar-se en ambients líquids, on són capaços de sintetitzar biofilm, i per tant es podran observar en sondes urinàries o al lumen dels catèters. En canvi, els organismes Gram-positius, com ara *S. aureus* i *S. hominis* aconsegueixen formar biofilm en la superfície externa del dispositiu. Aquests autors (Fernández-Barat et al. 2018) també recalquen la importància del temps d'incubació del dispositiu a l'interior del pacient, ja que, a major temps, més probabilitat que hagi colonització de bacteris i la presència de biofilm.

Els catèters tenen un paper molt important i diari en l'àmbit hospitalari, emprats per a l'administració de fluids (Cercenado et al., 2017). Per aquest motiu, en aquest treball, s'han aïllat una gran quantitat de soques procedents d'infeccions de catèters, coincidint amb l'estudi sobre MRSA i MSSA realitzat per Piechota et al. (2018), on els catèters es posicionaven com a segon dispositiu amb més incidència, després del tub endotraqueal (no avaluat en aquest treball). Els organismes colonitzadors d'aquest dispositiu, són *S. epidermidis*, present en quatre tipus de catèters diferents (catèter venós diàlisi, catèter venós central (CVC), catèter venós jugular i catèter arterial), *S. aureus* aïllat en diferents tipus (catèter venós perifèric i catèter Port – a – Cath), i *S. hominis* en els catèters arterials i els catèters Port – a – Cath. Dadi et al., (2021) van concloure que el catèter amb major possibilitat de colonització bacteriana i major incidència de biofilm fou el catèter arterial, seguit del CVC i el catèter venós jugular, fets que coincideixen amb aquest estudi.

Diferents autors (Cercenado et al., 2015; Dadi et al., 2021; Ferreira et al., 2019) van establir que els microorganismes amb major prevalença en les infeccions relacionades amb catèters són organismes comensals (formen part de la microbiota de la pell), que aconsegueixen penetrar a l'interior del dispositiu provocant infeccions nosocomials, com ara *S. epidermidis* i *K. pneumoniae* (Struelens et al., 2022 b,), així com organismes comuns en el ambient hospitalari, com ara *E. cloacae* i *S. aureus*, classificats com a organismes oportunistes, amb una elevada capacitat per formar biofilm.

Les sondes urinàries, al igual que els catèters, també són molt comuns i amb funcions importants per al pacient, com ara recollir la orina durant l'estància hospitalària (Percival et al., 2015b). Yadav et al. (2019) confirmen l'impacte de les infeccions relacionades amb el tracte urinari (UTI) com a principal motiu de morbiditat i mortalitat dels pacients hospitalitzats. L'estudi presentat per Percival et al. (2015) suggereix que el 10 % dels pacients als quals se'ls introdueix una sonda urinària, desenvolupa aquest tipus d'infeccions amb el perill que el pacient pugui desenvolupar una bacterièmia (Caldara et al., 2022; Percival et al., 2015b), sent molt important una prèvia valoració de la necessitat d'una sonda urinària i establir el temps d'ús del dispositiu a l'interior del pacient, on es recomana el menor temps possible per evitar infeccions, tot i sabent la dificultat que suposa pels hospitals (Dadi et al., 2021). El principal organisme aïllat de sondes en aquest estudi és *E. coli*, seguit de *P. aeruginosa*, *A. urinae* i *C. koseri*. Aquests resultats coincideixen amb dades d'altres estudis recents, on es demostra la predominança d'*E. coli* en les infeccions UTI i la presència d'altres organismes com ara *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* i *S. aureus*, aïllades també en el nostre estudi (Dadi et al., 2021; Yadav et al., 2019). Al igual que en els catèters, la colonització de les sondes es pot donar per organismes comensals com *E. coli*, que formen part de la microbiota intestinal, i aconsegueix penetrar al dispositiu gràcies a les mucoses pròpies de la bufeta i la zona rectal (Percival et al., 2015a), o per part d'organismes presents en l'ambient hospitalari amb una elevada patogenicitat, com per exemple *P. aeruginosa*. A més, segons Niveditha et al. (2012), existeixen algunes soques amb un grau de patogenicitat força elevat com la soca UPEC (*E. coli* uropatogènica), responsable de la majoria d'infeccions relacionades amb el tracte urinari. No obstant, en aquest treball no s'han realitzat una identificació del tipus de soques i per tant, no es pot afirmar la presència de la soca UPEC. A més, altres autors afirmen (Percival et al., 2015b; Yadav et al., 2019) que *P. mirabilis* és capaç de bloquejar el pas de líquid al llarg del tub formant taps de calci i fòsfat de magnesi que afavoreixen l'adhesió d'altres bacteris per formar biofilm, provocant infeccions que poden derivar en greus conseqüències per al pacient.

No obstant, com s'ha esmentat abans, el material que forma el dispositiu i el temps d'incubació a l'interior del pacient és determinant en la formació de biofilm i la resolució de les infeccions (Percival et al., 2015). Els catèters formats per materials com ara tefló o poliuretà són més propensos a l'adhesió de bacteris i la posterior formació de biofilm, en canvi els formats per altres materials com el polietilè són menys propensos, afirmant que el material del dispositiu és una variable essencial per disminuir la presència de biofilm (Dadi et al., 2021). Segons Percival et al. (2015), en una cohort de pacients amb càncer, van identificar biofilm després de 24 hores de la introducció del catèter, conclouent que és necessari considerar la

necessitat d'utilitzar un dispositiu mèdic, així com l'estat del pacient i el temps de d'incubació a l'interior del pacient. D'altra banda, les sondes estan formades per làtex o silicona, materials que permeten l'adhesió dels bacteris, i, juntament amb el flux d'orina, es dona l'ambient perfecte amb ions, polisacàrids i glicoproteïnes, que afavoreixen la formació de biofilm i per tant, UTIs (Caldara et al., 2022; Percival et al., 2015b).

Finalment, l'últim dispositiu avaluat en aquest estudi són les pròtesis, concretament la pròtesi biliar i la pròtesi articular, amb soques no pròpies d'aquest dispositiu, sinó també presents en catèters i sondes. Respecte a les pròtesis biliars, la revisió de Caldara et al. (2022), va relacionar alguns organismes de la microbiota intestinal, com a causants de biofilms en aquest dispositiu, amb la presència de *Bacillus*, *Enterococcus* spp. i *Stafilococcus* spp., coincidint amb els organismes d'aquest treball (*E. coli* i *C. koseri*). Segons Caldara et al. (2022); Dadi et al., (2021) els organismes més comuns en aquest tipus d'infeccions són *S. aureus*, *S. epidermidis* (*Staphylococcus* spp.) i *E. faecalis*, coincidint amb les soques aïllades en aquest treball. A més, aquests autors també afirmen que la colonització polimicrobiana és prou comú en aquests dos dispositius, fet que es corrobora amb les dues soques aïllades del mateix pacient corresponent a la pròtesi biliar.

Els resultats de l'avaluació de la capacitat productora de biofilm es poden comparar amb l'estudi realitzat per Folliero et al., (2021), on la classificació de les soques coincideix en els organismes *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. coli* i *E. faecium*. Existeix una correlació significativa entre la producció feble i els bacteris de Gram-positius, ja que hi ha un major nombre de soques de *S. epidermidis* que tenen una producció feble. Per contra, la correlació realitzada sobre la capacitat de producció de biofilm i el tipus de bacteris Gram-positiu vs Gram-negatiu no és significatiu, possiblement per la baixa quantitat de soques analitzades. Segons l'anàlisi realitzat tampoc és significativa la correlació entre la resistència bacteriana i la formació de biofilm. També cal recalcar, que en aquest estudi no s'ha realitzat la identificació de les soques, i els resultats obtinguts no es poden comparar de forma adequada amb el treballs previs.

Gràcies a l'anàlisi de la susceptibilitat bacteriana als antibiòtics, s'han observat les tendències de resistència i multiresistència en les soques avaluades. *Staphylococcus epidermidis* és resistent a un gran varietat de antibiòtics, concretament a la família de quinolones (CLI i SYN), les tetraciclins (SXT), alguns de la família dels glucopeptids (GEN i TOB), els betalactàmics (AMP, OXA i TZP), els aminoglucòsids (CIP i LVX) i altres antibiòtics com ara la mupirocina i la eritromicina, coincidint amb l'estudi de Socohou et al. (2020). A més,

és tracta d'una espècie generalment multiresistent, característica que ve donada per la gran quantitat d'infeccions que provoca, les quals són tractades amb antibiòtics convencionals. Tres de les quatre soques de *Staphylococcus aureus*, són resistents a la penicil·lina. No obstant, en aquest treball no s'ha avaluat la resistència a la metilcil·lina, a diferència de l'estudi realitzat per Tahaei et al.(2021), on classifica les soques de *S. aureus* segons si són MRSA o MSSA. En aquest estudi *E. coli* presenta resistència front diversos antibiòtics de la família dels aminoglucòsids (CIP i NOR), front alguns de la família dels betalactàmics (AMP i AMC) i el trimetoprim – sulfametoxazol (tetraciclina), sent dues soques multiresistents, resultats que coincideixen amb l'estudi de Folliero et al. (2021). Els resultats confirmen que *P. aeruginosa* és resistent a la ciprofloxacina i levofloxacina (aminoglucòsids), cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem i piperacilina – tazobactam (betalactàmics) i la trobamicina (glucopèptids), i una soca és multiresistent. També es va avaluar *E. cloacae*, que és resistent a quasi tots els antibiòtics de la família dels betalactàmics (AMP, AMC, TZP, ATM, FOX, CTX, CAZ, FEP i ETP) i a més, dos soques són multiresistents. Es va trobar una significança entre la multiresistència i el tipus d'organisme, la qual justifica les resistències pròpies de cada organisme, i la pròpia naturalesa del biofilm com estructura de protecció, on el seu microambient permet que els bacteris que el formen desenvolupen resistències front als antibiòtics que s'utilitzen per tractar les infeccions.

Com es pot veure la quantitat de soques multiresistents en aquest treball és el 40,6 % del total, nombre considerablement elevat, que aviva la necessitat de continuar investigant sobre el biofilm i trobar nous tractaments efectius.

No obstant això, aquest estudi també presenta limitacions, començant pel baix nombre de soques avaluat, afectant a la robustesa dels resultats obtinguts, continuant per la dificultat que suposa extrapolar els resultats de la determinació dels mètodes *in-vitro* a una situació *in-vivo*, ja que és força complicat reproduir l'ambient *in-vivo* on es formen els biofilms als hospitals. Aquest fet suposa que, aquest mètode no pugui reflexar la situació real del que realment ocorre a l'interior dels dispositius mèdics, i condemna a que els resultats estiguin condicionats a variables incontrolables. La continuada congelació i descongelació de les soques per avaluar-les també afecta a la producció *in-vitro* del biofilm.

Finalment, en aquest treball els biofilms multiespècie s'han avaluat separatament, i per tant no s'han obtés resultats conjunts perquè la seva avaluació implica un procediment diferent a seguir, juntament amb els resultats diferents de la determinació de la capacitat productora, ja que hi hauria que tenir en compte processos com el *quorum sensing*.

Existeix una gran necessitat de trobar alternatives als tractaments convencionals, com ara nous antibiòtics o aplicar l'ús d'adjuvants per facilitar l'entrada a l'interior del biofilm. Algunes propostes són l'ús de nanopartícules com adjuvants, o la inhibició del *quorum sensing* (Sharma et al., 2019). Recentment, es planteja la combinació de partícules naturals amb antibiòtics o l'ús d'anticossos monoclonals capaços de bloquejar les molècules d'adhesió, i així evitar la formació de biofilm (Raafat et al., 2019; Zafer et al., 2024).

8. CONCLUSIONS

En les mostres procedents de l'Hospital Universitari Joan XXIII s'han aïllat i identificat un total de 13 espècies formadores de biofilm en dispositius mèdics: *A. urinae*, *C. koseri*, *E. faecium*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* i *S. marcescens*.

El nostre estudi confirma que el microorganisme amb major prevalença relacionat amb infeccions associades a catèters i pròtesis és *S. epidermidis*, i que l'organisme associat a infeccions en sondes és *E. coli*. S'assegura a més, que el dispositiu amb una major incidència en formació de biofilms és el catèter.

Els organismes amb una producció forta de biofilm *in-vitro* són: *C. koseri*, *E. coli*, *E. faecium* i *P. aeruginosa*, i els organismes no productors de biofilm *in-vitro* en aquest estudi són *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. Mirabilis*, *S. epidermidis*, i *S. hominis*. Cal destacar que les soques d'*E. coli* presenten una producció de biofilm *in-vitro* de moderada a forta i algunes soques sense capacitat de produir biofilm. Les soques de *S. epidermidis* poden produir biofilm amb capacitat feble.

Respecte la determinació de la susceptibilitat als antibiòtics d'ús general, es pot concloure que l'antibiòtic amb una major eficàcia per tractar infeccions associades amb biofilm a dispositius mèdics, és la gentamicina, i el menys efectiu és l'amikacina.

L'organisme amb una major quantitat de soques multiresistents és *S. epidermidis*, i el que menys són *C. koseri*, *E. faecium*, *S. aureus* i *S. hominis*.

Finalment, no és poden extrapolar els resultats obtinguts de la capacitat productora de biofilm a partir de l'avaluació *in-vitro* d'aquestes soques, perquè les condicions *in-vivo* no es poden reproduir totalment al laboratori amb el mètode escollit. Respecte la susceptibilitat dels bacteris enfront als antibiòtics, aquestes dades si es poden extrapolar, ja que el protocol seguit no presentava un biaix tant elevat com en l'anterior determinació.

Així doncs, es pot concloure que gràcies a l'avaluació de 30 soques procedents de dispositius mèdics, es pot confirmar la hipòtesi plantejada prèviament, l'ambient del biofilm que es forma en els dispositius mèdics propicia el desenvolupament de la resistència als antibiòtics.

9. AVALUACIÓ PERSONAL

El meu Treball Final de Grau s'ha realitzat amb els resultats obtinguts de les pràctiques curriculars realitzades a l'equip d'investigació Infecció i Immunitat de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. Per mi ha sigut un repte que m'ha permès ampliar el meu coneixement sobre la biotecnologia, concretament la microbiologia.

El coneixement previ que tenia d'aquest camp era prou pobre, ja que només havia realitzat les pràctiques de l'assignatura de Microbiologia de la carrera. Allí vaig poder aprendre el més essencial del laboratori de microbiologia. No obstant, en les pràctiques realitzades associades al TFG, he pogut aprendre a treballar de forma autònoma al laboratori de microbiologia, on he après l'ús i la importància d'autoclavar els materials, fer els medis requerits de l'experiment i realitzar el protocol acuradament mantenint les condicions d'asèpsia en tot moment.

També he pogut adonar-me'n de l'elevada dificultat a l'hora d'obtenir resultats robustos per defensar la investigació, ja que si aquests són erronis s'ha de buscar l'error i un motiu, per repetir l'experiment corregint – lo.

Sobretot, la realització d'aquest treball m'ha permès endur-me una petita experiència del que seria treballar en el món de la recerca, que mai oblidaré.

Considero que he pogut adquirir una gran quantitat de coneixement de les pràctiques realitzades i d'aquest treball, que m'ha permès créixer com a biotecnòloga de cara al meu futur professional.

10. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, M. J. (2017). Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: Review. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 50, pp. 1–10). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.004>
- Allkja, J., Bjarnsholt, T., Coenye, T., Cos, P., Fallarero, A., Harrison, J. J., Lopes, S. P., Oliver, A., Pereira, M. O., Ramage, G., Shirliff, M. E., Stoodley, P., Webb, J. S., Zaat, S. A. J., Goeres, D. M., i Azevedo, N. F. (2020). Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Biofilm*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100010>
- amr-santa-cruz-siglas*. (n.d.).
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., I Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 43, Issue 3, pp. 313–351). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Caldara, M., Belgiovine, C., Secchi, E., i Rusconi, R. (2022). Environmental, Microbiological, and Immunological Features of Bacterial Biofilms Associated with Implanted Medical Devices. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 35, Issue 2). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/cmr.00221-20>
- Cercenado, E., Rafael, M., Moreno, C., Oteo, J., Germán, I., Arevalo, B., Chaves Sánchez, F., Oliver, A., Jesús, P., i Iglesias, O. (n.d.). *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes Editores Coordinador Autores*. www.seimc.org
- Cercenado Mansilla Rafael Cantón Moreno María Luisa Mateos Lindemann María Luisa Mateos Lindemann Sonia Pérez-Castro María Teresa Pérez-Gracia Manuel Rodríguez-Iglesias, E., i Cercenado Mansilla María Macià Romero José Luis Del Pozo León Rafael Cantón Moreno María Díez Aguilar Jesús Guinea Ortega María D Macià Romero, E. D. (n.d.-a). *Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano Editores Coordinador Autores 60 Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas*. www.seimc.org
- Cercenado Mansilla Rafael Cantón Moreno María Luisa Mateos Lindemann María Luisa Mateos Lindemann Sonia Pérez-Castro María Teresa Pérez-Gracia Manuel Rodríguez-Iglesias, E., i Cercenado Mansilla María Macià Romero José Luis Del Pozo León Rafael Cantón Moreno María Díez Aguilar Jesús Guinea Ortega María D Macià Romero, E. D.

(n.d.-b). *Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano* Editores Coordinador Autores 60 *Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas*. www.seimc.org

Coffey, B. M., i Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 631–641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48

Dadi, N. C. T., Radochová, B., Vargová, J., i Bujdáková, H. (2021). Impact of healthcare-associated infections connected to medical devices—an update. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112332>

Del Pozo, J. L. (2018). Biofilm-related disease. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 16, Issue 1, pp. 51–65). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

Di Domenico, E. G., Toma, L., Provot, C., Ascenzioni, F., Sperduti, I., Prignano, G., Gallo, M. T., Pimpinelli, F., Bordignon, V., Bernardi, T., i Ensoli, F. (2016). Development of an in vitro assay, based on the biofilm ring test®, for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01429>

Fernández-Barat, L., Ben-Aicha, S., Motos, A., Vila, J., Marco, F., Rigol, M., Muñoz, L., Li Bassi, G., Ferrer, M., i Torres, A. (2018). Assessment of in vivo versus in vitro biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from endotracheal tubes. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30494-7>

Ferreira, R. B. R., Ferreira, M. C. S., Glatthardt, T., Silvério, M. P., Chamon, R. C., Salgueiro, V. C., Guimarães, L. C., Alves, E. S., i dos Santos, K. R. N. (2019). Osmotic stress induces biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.02.009>

Flemming, H. C., i Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>

Folliero, V., Franci, G., Dell'annunziata, F., Giugliano, R., Foglia, F., Sperlongano, R., De Filippis, A., Finamore, E., i Galdiero, M. (2021). Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Production among Clinical Strain Isolated from Medical Devices. *International Journal of Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9033278>

- Foti, C., Piperno, A., Scala, A., i Giuffrè, O. (2021). Oxazolidinone antibiotics: Chemical, biological and analytical aspects. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26144280>
- García Quetglas, E., Perea, J. R. A., Sádaba Díaz De Rada, B., i Gil Aldea, I. (2003). Pharmacology of antimicrobials used in the treatment of serious Gram-positive bacteria infections. In *Septiembre* (Vol. 16, Issue 3).
- Hanekamp, J. C., i Bast, A. (2015). Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 213–220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.016>
- Herrling, M. P., Lackner, S., Nirschl, H., Horn, H., i Guthausen, G. (2019). Recent NMR/MRI studies of biofilm structures and dynamics. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Vol. 97, pp. 163–213). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.arnmr.2019.02.001>
- Høiby, N. (2014). A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. In *Pathogens and Disease* (Vol. 70, Issue 3, pp. 205–211). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12165>
- Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. In *APMIS* (Vol. 125, Issue 4, pp. 272–275). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>
- Høiby, N., i Axelsen, N. H. (1973). IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF PRECIPITINS AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS BY MEANS OF CROSSED IMMUNOELECTROPHORESIS WITH INTERMEDIATE GEL. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 81 B(3), 298–308. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1973.tb02207.x>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., i Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. In *Journal of the Chinese Medical Association* (Vol. 81, Issue 1, pp. 7–11). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., i Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. In *Trends in Microbiology* (Vol. 28, Issue 8, pp. 668–681). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Lenz, K. D., Klosterman, K. E., Mukundan, H., i Kubicek-Sutherland, J. Z. (2021). Macrolides: From toxins to therapeutics. In *Toxins* (Vol. 13, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins13050347>

- Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., i Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 208). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- Long, J., Ji, W., Zhang, D., Zhu, Y., i Bi, Y. (2021). Bioactivities and Structure–Activity Relationships of Fusidic Acid Derivatives: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.759220>
- March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>
- Niveditha, S., Pramodhini, S., Umadevi, S., Kumar, S., i Stephen, S. (2012). The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6(9), 1478–1482. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4367.2537>
- O'Toole, G. A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Pacheco, P. O., Del Carmen Suárez-Arrabal, M. ^a, i Esparza Olcina, J. (n.d.). *Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos*. <https://www.guia-abe.es>
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., i Donelli, G. (2015a). Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 64, Issue 4, pp. 323–334). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000032>
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., i Donelli, G. (2015b). Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 64, Issue 4, pp. 323–334). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000032>
- Perry, E. K., i Tan, M. W. (2023). Bacterial biofilms in the human body: prevalence and impacts on health and disease. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1237164>
- Piechota, M., Kot, B., Frankowska-Maciejewska, A., Gruzewska, A., i Woźniak-Kosek, A. (2018). Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4657396>

- Raafat, D., Otto, M., Reppschläger, K., Iqbal, J., i Holtfreter, S. (2019). Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies. In *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Issue 4, pp. 303–322). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.009>
- Rather, M. A., Gupta, K., i Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 52, Issue 4, pp. 1701–1718). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., i Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 10, pp. 608–620). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Sharma, D., Misba, L., i Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. In *Antimicrobial Resistance and Infection Control* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Socohou, A., Sina, H., Degbey, C., Nanoukon, C., Chabi-Sika, K., Ahouandjinou, H., Lehmane, H., Baba-Moussa, F., i Baba-Moussa, L. (2020). Antibiotics Resistance and Biofilm Formation Capacity of *Staphylococcus* spp. Strains Isolated from Surfaces and Medico-technical Materials. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6512106>
- Special Issue Characteristics of Biofilms on Indwelling Medical Devices.* (n.d.).
- Spížek, J., i Řezanka, T. (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 133, pp. 20–28). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G. DI, Djukic, S., Ruzicka, F., i Bonaventura, D. G. (2007). The Authors Printed in Denmark. *All Rights Reserved Journal Compilation C*, 115, 891–900.
- Struelens, M. J., Kumar, N., Ragupathi, D., Veeraraghavan, B., Karunakaran, E., i Monk, P. N. (n.d.-a). *OPEN ACCESS EDITED AND REVIEWED BY Editorial: Biofilm-mediated nosocomial infections and its association with antimicrobial resistance: Detection, prevention, and management.*
- Struelens, M. J., Kumar, N., Ragupathi, D., Veeraraghavan, B., Karunakaran, E., i Monk, P. N. (n.d.-b). *OPEN ACCESS EDITED AND REVIEWED BY Editorial: Biofilm-mediated nosocomial infections and its association with antimicrobial resistance: Detection, prevention, and management.*

- Tahaei, S. A. S., Stájer, A., Barrak, I., Ostorházi, E., Szabó, D., i Gajdács, M. (2021). Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in staphylococcus aureus isolates: A laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1155–1168. <https://doi.org/10.2147/IDR.S303992>
- Tolker-Nielsen, T. (2015). *Biofilm Development*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., i Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 14, Issue 12, pp. 1750–1766). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Yadav, M. K., Vidal, J. E., i Song, J. J. (2019). Microbial biofilms on medical indwelling devices. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms* (pp. 15–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00002-5>
- Zafer, M. M., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., Ghosh, S., Bornman, C., i Elfaky, M. A. (2024). Biofilm-mediated infections by multidrug-resistant microbes: a comprehensive exploration and forward perspectives. In *Archives of microbiology* (Vol. 206, Issue 3, p. 101). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03826-z>

11. ANNEXOS

També es van avaluar dos soques procedents de mostres de sang i d'orina. La mostra de sang es va aïllar *S. aureus* i a la mostra d'orina *E. faecalis*.

Per una banda la soca *S. aureus* va ser determinada com a no productora de biofilm després de l'avaluació i no presenta multirresistència, i la soca *E. faecalis* també va ser determinada com a no productora i tampoc presenta multirresistència.

Taula A1. Resum de les característiques més importants de cada família d'antibiòtics.

Família	Subgrup	Mode d'acció	Microorganismes susceptibles	Exemples
Aminoglicòsids		S'uneix al ribosoma i provoca la producció de proteïnes anòmales.	Bacils Gram-negatius i <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Amicacina, gentamicina, tobramicina.
Betalactàmics	Penicil·lina	Capaços d'inhibir la síntesi completa de peptidoglicà, provocant l'activació dels enzims autolítics i la mort de la cèl·lula.	Són efectius contra bacteris Gram-positius i Gram-negatius .	Ampicil·lina, i amoxicil·lina ticarcil·lina.
	Cefalosporines		Enterococs, <i>Listeria monocytogenes</i> i estafilococs.	Cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftaxima, ceftazidima i cefuroxima.
	Monobactàmics		Bacteris Gram-negatius anaerobis i <i>Pseudomonas spp.</i>	Aztreonam.
	Carbapenems		Bacteris Gram-positius, bacteris Gram-negatius i anaerobis.	Ertapenem, imipenem i meropenem.
	Inhibidors de les betalactamases		Unió irreversible a les betalactamases inhibint la seva acció de degradació de l'antibiòtic, i bloquejant la resistència.	
Anfenicols		Interferència en la síntesi proteica bacteriana, unint-se al ribosoma impeding la correcta traducció.	Bacteris Gram-positius, <i>Streptomyces venezuelae</i> .	Cloramfenicol
Glucopèptids		Inhibició de la formació de la paret bacteriana.	Cocs Gram-positius i alguns bacils Gram-positius.	Teicoplanina i vancomicina.

Lincosamides		Interferència del procés de traducció mitjançant la unió a la unitat gran del ribosoma.	Actiu front a bacteris Gram-positius i microorganismes anaerobis.	Clindamicina i lincomicina.
Macròlids	14 àtoms, 15 àtoms, 16 àtoms.	Inhibir la síntesi proteica unint-se al ribosoma.	Comparteixen espectre bacterià amb les penicil·lines. També contra <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , entre altres.	Azitromicina, claritromicina i eritromicina.
Nitroimidazols		Internalització al citoplasma de la cèl·lula per a que la seva hidròlisis doni lloc a una molècula reduïda que produeix dany al DNA.	Bacteris anaerobis, protozous, <i>H. pylori</i> , i <i>E. coli</i> i <i>Klebsiella</i> spp.	Benzimidazol, metronidazol i tinidazol.
Oxazolidinones		Inhibició de la traducció unint-se a les dos subunitats del ribosoma, provocant un bloqueig total.	Ampli espectre bacterià. Sobretot contra bacteris Gram-positius.	Linezolid i Tedizolid.
Quinolones		Inhibeix l'activitat de la DNA girasa i la topoisomerasa 5, (duplicació i transcripció del genoma).	Tres generacions: la primera és específica de Gram-negatius, la segona Gram-positius i Gram-negatius, i la tercera té un gran potencial, sobretot per tractar infeccions urinàries.	Àcid nalidíxic, ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina i norfloxacina
Rifamicines		Inhibir la RNA polimerasa.	Bacteris Gram-positius i gram-negatius.	Rifabutina i rifampicina.

Sulfonamides		Inhibir la síntesi d'àcid fòlic.	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Meningococcus</i> spp...	Cotrimoxazol (combinació de trimetoprim i sulfametoxazol) i sulfadiazina.
Tetraciclines		Impedir que el ribosoma es pugui unir al RNA de transferència, mitjançant la seva unió a la subunitat petita del ribosoma.	Bacteris Gram-positius i Gram-negatius, micobacteris i protozous.	Doxiciclina, tigeciclina i tetraciclina.
Miscelània	Àcid fusídic	S'uneix al factor d'allargament G i inhibeix la síntesi proteica.	<i>S. aureus</i> , <i>Clostridium</i> spp. i bacteris anaerobis	Àcid fusídic.
	Daptomicina	Formar canals a les membranes dels bacteris Gram-positius, provocant la sortida d'ions potassi (K ⁺) i la mort de la cèl·lula.	Bacteris Gram-positius, <i>S. aureus</i> resistent a la meticil·lina (MRSA) i alguns pneumococs.	Daptomicina.
	Fosfomicina	Bloquejar la síntesi dels precursors del peptidoglicà.	Bacteris Gram-positius i Gram-negatius.	Fosfomicina.
	Mupirocina	Activitat bactericida, bloquejant la síntesi de proteïnes.	<i>Streptococcus</i> spp. i <i>Staphylococcus</i> spp.	Mupirocina.
	Nitrofurantoïna	Inhibició de la síntesi proteica.	Bacteris Gram-positius i Gram-negatius.	Nitrofurantoïna.