



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina**

Programa de doctorat en Medicina,
Departament de Medicina

**Eficàcia *in vitro* i *in vivo* de diferents antimicrobians enfront *Staphylococcus*
spp. i *Candida* spp. creixent en biopel·lícules i causants d'infeccions de catèter
de llarga durada**

Tesi doctoral presentada per:

JANA BASAS SATORRAS

Per optar al grau de Doctor

Directors:

**Dr. JOAN GAVALDÀ SANTAPAU
Dr. BENITO ALMIRANTE GRAGERA**

Tutor:

Dr. CARLES PIGRAU SERRALLACH

Juliol de 2018

Joan Gavalda Santapau, Doctor en Medicina i adjunt del Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron,

Benito Almirante Gragera, Professor Associat de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de Servei del Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron

i

Carles Pigrau Serrallach, Professor titular de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap Clínic del Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron

Certifiquen que la tesi doctoral titulada:

“Eficàcia *in vitro* i *in vivo* de diferents antimicrobians enfront *Staphylococcus* spp. i *Candida* spp. creixent en biopel·lícules i causants d'infeccions de catèter de llarga durada”

Que presenta la graduada **Jana Basas Satorras**, ha sigut realitzada sota la seva direcció, reuneix les exigències metodològiques i científiques necessàries per a què la interessada pugui optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Jana Basas Satorras
Doctoranda

Dr. Joan Gavalda Santapau
Director de la tesi doctoral

Dr. Carles Pigrau Serrallach
Tutor de la tesi doctoral

Dr. Benito Almirante Gragera
Director de la tesi doctoral

A Barcelona, 20 de Juliol de 2018

A la meva família

Al Javi

*“Discovery consists of seeing what everybody has seen,
and thinking what nobody has thought”*

Albert Szent

AGRAÏMENTS

D'una forma molt especial vull agrair a totes les persones que d'una manera o una altra han participat de forma directa o indirecta en la realització d'aquesta tesi. Arribar a aquesta meta ha sigut possible gràcies a l'ajuda desinteressada de cada un de vosaltres. Tot i que acabo aquesta etapa de la meva vida, sempre recordaré aquests anys amb una quantitat de records, experiències i alegries viscudes al Laboratori de Resistència als Antibiòtics del Servei de Malalties Infeccioses, on vaig arribar amb la idea de realitzar les pràctiques de final de carrera i vaig tenir la sort que em brindéssiu la oportunitat per a poder-hi fer les pràctiques del màster i, posteriorment, la Tesi Doctoral. Tinc la ferma percepció que vaig tenir l'enorme sort de "danar a parar" en un lloc molt especial. Durant aquests anys m'heu encoratjat a tenir idees pròpies, a ser autocrítica, a buscar nous camins i a trobar el que més m'interessa, però sempre amb la confiança que dóna saber que et reconduiran si te'n vas cap a un carreró sense sortida. He gaudit molt d'aquesta experiència i no tinc suficients paraules d'agraïment per tot el que m'heu ensenyat i per la confiança dipositada en mi. El meu agraïment als directors i tutor de tesi, per acceptar-me a realitzar aquesta Tesi Doctoral sota la seva direcció. M'heu ensenyat la ciència i a fer ciència d'una manera que hauria de ser exemple per tots. Gràcies Dr. Joan Gavalrà, per la teva confiança dipositada en mi durant aquests anys, gràcies per la saviesa amb la que has guiat cada una de les meves passes, gràcies per comptar sempre amb mi i per no perdre la fe en mi inclús quan jo ja ho havia fet. Gràcies Dr. Benito Almirante, per confiar en mi des del principi, per fer-me sentir una més del Servei de Malalties Infeccioses, per la gran capacitat de docència i per transmetre'm rigor i esperit crític. Gràcies Dr. Carles Pigrau per tenir sempre un moment per escoltar-me i per transmetre sempre un entusiasme contagiós en el món de les malalties infeccioses. Finalment, gràcies a tots per la meticulosa i tan útil correcció, per transmetre'm la passió i l'entusiasme pel món de la investigació en el camp de les malalties infeccioses.

Els resultats científics no apareixen sobre la taula de l'investigador, així que és primordial agrair a l'equip d'investigació del laboratori per tot el seu suport des de l'inici. Sense la vostra ajuda aquesta tesi no s'hauria pogut realitzar. Gràcies per les vostres hores dedicades i per fer que la feina del dia a dia sigui molt més fàcil i agradable. Xavi, gràcies per estar sempre disposat a donar-me un cop de mà i pels teus consells invaluables tan en les coses professionals com personals. I a tu, Marta, pels consells, per la teva disponibilitat, amabilitat i escoltar-me en els moments més difícils.

Aquesta tesi, com no podria ser d'altra manera, la comparteixo amb els meus pares i les meves germanes. Pares, sóc el que sóc gràcies a vosaltres. La meva gratitud és immensa i espero que algun dia us pugui tornar una part de tot el que heu fet i feu per mi, tot i que qualsevol cosa serà poca. Gràcies per ensenyar-me a veure la part optimista de les coses, pel recolzament i el suport incondicional que sempre he tingut i per guiar-me i donar-me els ànims, energia i total seguretat que un necessita en tot moment. Marta, Helena i Marina, gràcies per estar sempre al meu costat, per ensenyar-me, per escoltar-me i aconsellar-me. Gràcies per estar amb mi en tots els moments de la meua vida, no podria tenir millors germanes.

Al meu marit Xavi, el meu gran pilar. Ets el meu suport en tot moment i la meua inspiració al sentir-te tan orgullós de mi. Gràcies per estar dia a dia al meu costat, pel suport i ajut incondicional, per entendre'm, per estimar-me, per acompanyar-me en aquest camí anomenat vida fent que tot sigui més fàcil i, en definitiva, gràcies per fer-me feliç!

A tots els meus amics i amigues, per aguantar la meua bogeria i les meves bromes. Gràcies per tots els moments inoblidables, fent que les meves alegries fossin molt més grans i les meves penes es veiessin reduïdes.

Tinc molta sort. Gràcies a tots.

ABREVIATURES

ABLC: complexos lipídics d'amfotericina B

ADN: àcid desoxiribonucleic

ALA: alanina

ALT: *antimicrobial lock technique*

AmB: amfotericina B

ANOVA: anàlisi de variància

ARN: àcid ribonucleic

BACVC: bacterièmia associada amb el catèter venós central

BRCVC: bacterièmia relacionada amb el catèter venós central

CA: *Candida albicans*

Ca²⁺: calci

CDC: Centres de Control i Prevenció de Malalties

CE: corrent elèctrica

CEEA: Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal

CG: *Candida glabrata*

CLABSI: *Central-Line Associated Bloodstream Infection*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLSM: *Confocal Laser Scanning Microscopy*

cm: centímetres

CMEB: concentració mínima eradicadora del *biofilm*

CMEB₉₀: concentració mínima eradicadora del *biofilm* al 90%

CMI: concentració mínima inhibidora

CMIB₅₀: concentració mínima inhibidora del *biofilm* al 50%

CMIB₉₀: concentració mínima inhibidora del *biofilm* al 90%

CP: *Candida parapsilosis*

CRBSI: *Catheter-Related Bloodstream Infection*

CVC: catèter venós central

DAAM: Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural

dAmB: amfotericina B deoxicolat

ECM: *extracellular matrix*

ECN: espècie coagulasa negativa

ENVIN: Estudio de Vigilancia de la Infección Nosocomial en las Unidades de Críticos

EPINE: Sociedad Española de Medicina Preventiva y Salud Pública

EPS: *extracellular polymeric substances*

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HAI: *Hospital-Acquired Infection*

HCIO: àcid hipoclorós

IDSA: *Infectious Diseases Society of America*

IRAS: infeccions relacionades amb l'assistència sanitària

ITS: infeccions del torrent sanguini

Kg: kilograms

L: litres

LAmB: Amfotericina B liposomal

LTCVC: *long-term central venous catheter*

mA: miliampers

MEC: matriu extracel·lular

mg: mil·ligrams

mL: mil·lilitres

mM: milimolars

NNIS: *National Nosocomial Infections Surveillance*

PI: *propidium iodide*

POC: *Proof-of-Concept*

SARM: *Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina

SE: *Staphylococcus epidermidis*

SPE: substàncies polimèriques extracel·lulars

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

UCI: Unitat de Cures Intensives

UE: Unió Europea

UFC: unitats formadores de colònia

UI: unitats internacionals

VBNC: *viable but non-culturable cells*

VHIR: Vall d'Hebron Institut de Recerca

VIH: virus de la immunodeficiència humana

VINCat: Programa de Vigilància de les Infeccions Nosocomials als Hospitals de Catalunya

XDR: *extreamly drug-resistant*

XTT: *2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphonyl)- 5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide*

ÍNDEX

ÍNDEX

	Pàg.
AGRAÏMENTS	
ABREVIATURES	
I. RESUM	23
II. INTRODUCCIÓ	27
1. Infecció relacionada amb els catèters venosos centrals de llarga durada	27
1.1. Concepte	27
1.2. Epidemiologia	29
1.3. Microbiologia	30
2. Patogènia	31
2.1. Biopel·lícules	33
2.1.1. Definició	33
2.1.2. Formació de les biopel·lícules	35
2.1.3. Mecanismes de resistència dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules	39
3. Tractament	53
3.1. Tractament de les infeccions relacionades als LTCVC	53
3.1.1. Estratègia de retirada del catèter	55
3.1.2. Estratègia conservadora del catèter	56
3.2. Tractament utilitzant la tècnica de l' <i>antimicrobial lock</i>	56
3.2.1. Antibioteràpia ALT de les infeccions relacionades amb els catèters produïdes per <i>Candida</i> spp.	58
3.2.2. Antibioteràpia ALT de les infeccions relacionades amb els catèters produïdes per ECN d'estafilococs	64
3.2.3. Segellat amb etanol	67

4.	Models d'infecció experimental	67
4.1.	Models d'estudi <i>in vitro</i>	68
4.1.1.	Determinació de l'activitat metabòlica dels microorganismes creixent en biopel·lícules	69
4.1.2.	Tècniques mitjançant cultius quantitius	70
4.1.3.	Tècniques de viabilitat en microscòpia	71
4.2.	Models <i>in vivo</i> d'infecció relacionada amb el catèter en conill	71
4.2.1.	Experiència prèvia del model en el laboratori de Resistència als Antibiòtics del Servei de Malalties Infeccioses del VHIR	73
III.	JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I HIPÒTESIS DE TREBALL	77
IV.	OBJECTIUS	85
V.	MATERIALS I MÈTODES	89
1.	Selecció de soques	89
2.	Estudis <i>in vitro</i>	89
2.1.	Esquema del disseny experimental: <i>in vitro</i>	89
2.2.	Estudis de sensibilitat	90
2.3.	Estudis de morfologia i viabilitat cel·lular	91
3.	Estudis <i>in vivo</i>	92
3.1.	Comitè Ètic d'Experimentació Animal	92
3.2.	Esquema del disseny experimental: <i>in vivo</i>	92
3.2.1.	Model d'infecció de catèter	93
3.2.2.	Grups de tractament	94
3.2.3.	Anàlisi estadístic	94
VI.	RESULTATS	97

TREBALL 1: Eficàcia de l'anidulafungina en el tractament d'infecció de catèter experimental per <i>Candida parapsilosis</i> utilitzant la tècnica de l' <i>antibiotic lock</i>	97
TREBALL 3: Alta dosis de daptomicina és efectiva com a <i>antibiòtic lock therapy</i> en un model d'infecció de catèter per <i>Staphylococcus epidermidis</i> en conill	107
VII. DISCUSSIÓ	115
VIII. CONCLUSIONS	131
IX. LÍNIES DE FUTUR	135
X. BIBLIOGRAFIA	141
XI. ANNEX	177
ANNEX 1: Article pendent de publicació	
TREBALL 2: Eficàcia de l'anidulafungina en el tractament d'infecció de catèter experimental per <i>Candida parapsilosis</i> utilitzant la tècnica de l' <i>antibiotic lock</i>	177

I. RESUM

I. RESUM

Introducció: els catèters venosos centrals de llarga durada (LTCVCs) són la solució pels pacients amb malalties cròniques o greus que necessiten un accés vascular permanent per l'administració de tractaments prolongats. Malgrat la seva importància clínica i els múltiples beneficis que aporten, el seu ús comporta un risc d'infecció que està associat a una elevada morbiditat i mortalitat, derivant a una hospitalització prolongada i el consegüent increment del cost econòmic associat. Objectiu: avaluar l'eficàcia de diferents antimicrobians utilitzant la tècnica del segellat de catèter enfront soques de *Candida* spp. i *Staphylococcus epidermidis* creixent en biopel·lícules, tant *in vitro* com en un model experimental d'infecció de catèter en conills.

Materials i Mètodes: s'han utilitzat 6 aïllaments clínics de *Candida* spp. i 2 de *S. epidermidis* productors de biopel·lícules. S'han realitzat estudis de sensibilitat *in vitro* de les soques creixent en biopel·lícules enfront diferents antimicrobians i un model experimental d'infecció de catèter en conill per avaluar l'eficàcia dels diferents antimicrobians mitjançant l'*antimicrobial lock technique* (ALT).

Resultats: en el cas de les infeccions de catèter produïdes per *Candida* spp., el tractament va ser depenent d'espècie. En soques de *C. albicans*, els tractaments d'ALT amb amfotericina B liposomal 5 mg/mL i anidulafungina 3.33 mg/mL van presentar una eficàcia similar. Per contra, en el model de *C. glabrata* i *C. parapsilosis*, l'anidulafungina 3.33 mg/mL va ser el tractament més eficaç. Daptomicina 50 mg/mL com a ALT, va ser el tractament amb major activitat en el model experimental d'infecció per *S. epidermidis*, negativitzant la majoria dels catèters a les 24 hores.

Conclusió: aquestes opcions terapèutiques podrien presentar una avantatge terapèutica en el tractament conservador de les infeccions relacionades als LTCVCs, utilitzant l'*antimicrobial lock technique*, en els casos seleccionats de pacients en que no fos possible la seva retirada i les condicions dels pacients ho permetessin.

Introduction: Long-term central venous catheters (LTCVCs) are the solution for patients with chronic or severe disease who require a permanent vascular access for a long-term treatment. Despite their clinical importance and the multiple benefits they entail, their use comes with a risk of infection associated with high morbidity and mortality, resulting in a prolonged hospitalization and a consequent increase of the cost. Objective: to evaluate the efficacy of different antimicrobials using the antimicrobial lock technique (ALT) against different species of *Candida* spp. and *Staphylococcus epidermidis* growing in biofilms, both *in vitro* and in an experimental model of catheter infection in rabbits.

Materials and Methods: 6 clinical isolates of *Candida* spp. and two of *S. epidermidis* producing biofilms have been used. *In vitro* susceptibility studies have been made of different strains growing in biofilms against the different antimicrobials and an experimental model of catheter infection have been carried out to evaluate the efficacy of the different antimicrobials using the antimicrobial lock technique.

Results: In the case of catheter infections caused by *Candida* spp. the treatment was species-dependent. In the *C. albicans* model, treatment with ALT liposomal amphotericin B 5 mg/mL or anidulafungin 3.33 mg/mL had similar efficacy. In contrast, in the *C. glabrata* and *C. parapsilosis* model, anidulafungin 3.33 mg/mL was the most effective treatment. Daptomycin 50 mg/mL as ALT was the treatment with the highest activity in the experimental model by *S. epidermidis*, negativizing most of the catheters at 24 h.

Conclusion: These therapeutic options could have a therapeutic advantage in the conservative treatment of LTCVC-related infections, using the antimicrobial lock technique, in selected cases where removal is not possible and patient conditions allow it.

II. INTRODUCCIÓ

II. INTRODUCCIÓ

1. Infecció relacionada amb els catèters venosos centrals de llarga durada

1.1. Concepte

Els catèters venosos centrals (CVCs) són una eina fonamental a la pràctica clínica moderna i són utilitzats amb una alta freqüència en pacients crítics. Els CVCs permeten l'administració segura de líquids de reanimació, medicaments intravenosos que no es poden aplicar per vies perifèriques i, a part, ajuden a mesurar paràmetres hemodinàmics en pacients amb síndromes de xoc sèptic o cardiogènic, insuficiència cardíaca i hipertensió pulmonar. Els pacients amb malalties cròniques com càncer de tumor sòlid, patologies hematològiques, digestives, fibrosis quística o infecció pel VIH requereixen, en ocasions, de CVCs de llarga durada o permanents (LTCVC de l'anglès *long-term central venous catheter*) per a l'administració de fàrmacs que no poden administrar-se per altres vies venoses, així com per a l'hemodiàlisi o els casos específics que requereixen necessàriament nutrició parenteral de llarga duració, tals com pacients amb síndrome de l'intestí curt o síndrome de mala absorció (1,2).

Malgrat la seva importància clínica i els múltiples beneficis dels LTCVCs, el seu ús constitueix una font d'infecció potencial tant local com sistèmica del torrent sanguini (bacterièmia o fungèmia). Per aquest motiu, en els darrers anys s'ha fet un esforç considerable per a intentar reduir la incidència de la bacterièmia associada a catèter venós central (3).

Els sistemes de vigilància del CDC dels Estats Units (*National Nosocomial Infections Surveillance*; NNIS) (4)(5), defineixen les bacterièmies relacionades amb els CVCs (BRCVC) (CRBSI de l'anglès *Catheter-Related Bloodstream Infection*), com una bacterièmia confirmada pel laboratori amb la presència d'una via central que ha estat col·locada un mínim de 48 hores. Aquesta definició és clínica i requereix, a part de l'hemocultiu, proves específiques de laboratori per identificar el catèter com a font de bacterièmia; és a dir, l'estudi microbiològic d'aquest. Com que hi ha ocasions en que els cultius del catèter poden no estar disponibles, els sistemes de vigilància del CDC van

proposar com a alternativa per a la vigilància epidemiològica utilitzar una definició simplificada, considerant com a bacterièmia associada amb els CVCs (BACVC) (CLABSI de l'anglès *Central-Line Associated Bloodstream Infection*) totes les bacterièmies que tenen els pacients portadors de CVC, quan altres focus d'infecció hagin sigut descartats. No obstant això, atès que algunes bacterièmies són secundàries a altres focus diferents al catèter i no es reconeixen fàcilment (pancreatitis, mucositis, etc.), la definició de BACVC pot sobreestimar la veritable incidència de la BRCVC. Així doncs, la definició de BACVC permet considerar una bacterièmia com associada al catèter sense necessitat de l'estudi microbiològic del mateix (4,5).

Tanmateix, la importància clínica d'aquestes infeccions és deguda a que s'associen a una elevada morbiditat i mortalitat, en especial a les Unitats de Cures Intensives (UCIs), ocasionant una hospitalització prolongada i el consegüent increment del cost sanitari que això comporta (6). De mitjana, els pacients amb BACVC són més propensos a haver patit altres infeccions relacionades amb l'assistència sanitària (IRAS) (HAI de l'anglès *Hospital-Acquired Infection*) durant l'hospitalització que els pacients sense aquest tipus d'infecció (67,5% *versus* 30,4%). Als Estats Units, la prolongació de l'hospitalització és d'uns 7-12 dies (7), amb un cost incrementat en 33.000 dòlars per aquells pacients amb BACVC, independentment de si aquests estaven a la UCI o no. Aquesta xifra és similar a les estimacions prèviament publicades per Pittet *et al.* (8), on van examinar els costos addicionals atribuïbles a les infeccions del torrent sanguini (ITS) en un estudi de cas-control comparatiu dels pacients de la UCI, i van observar un cost addicional dels supervivents de 41.000 dòlars. En un altre anàlisi realitzat per Digiovine *et al.* (9), els pacients supervivents amb ITS van presentar un augment dels costos directes de 34.000 dòlars respecte els pacients sense ITS. Addicionalment, un estudi descrit per Blot *et al.* (10), van analitzar les BRCVC en països europeus i descriuen un increment de 12 dies d'hospitalització, 8 dels quals són a la UCI, amb un cost atribuïble de 13.585 euros per pacient (10). En resum, la BRCVC ocasiona anualment de 15.960 a 261.000 dies extres d'hospitalització a les UCIs causant un cost associat de 35,9-163,9 milions d'euros (11).

Finalment, un estudi espanyol sobre la BRCVC constata un increment de les estàncies hospitalàries d'uns 20 dies amb un cost addicional de 3.000 euros per episodi (12).

Així doncs, disposar d'un accés vascular segur i funcional, sense cap infecció relacionada amb el dispositiu de llarga durada, és fonamental per reduir la morbiditat i la mortalitat d'aquests pacients i l'important cost sanitari que comporta.

1.2. Epidemiologia

En la majoria d'estudis s'utilitza la BRCVC com a mesura d'infecció relacionada amb el dispositiu, i es recomana que les taxes s'expressin en episodis de BRCVC/1.000 dies d'utilització del catèter. La incidència d'aquesta pot variar segons la unitat o servei hospitalari, la característica dels pacients, la freqüència de manipulació del catèter i la localització del mateix. Tot i que la verdadera incidència de la BACVC no és realment coneguda, l'any 2014 es va assolir l'objectiu establert del 2013 del "*HAI Action Plan*" disminuint un 50% aquest tipus d'infeccions entre el 2008 i el 2014 (4). Tanmateix, s'estima que cada any hi segueixen havent uns 30.100 casos d'infecció de BACVC a les UCIs (5), amb un rang que oscil·la entre 1,8 a 5,2 episodis/1.000 dies d'utilització del dispositiu (13,14).

Un estudi realitzat a Europa el 2004 mostra xifres de 1,02 episodis de BRCVC/1.000 dies d'admissions (15), dels quals cal remarcar que 1,55 episodis/1.000 admissions esdevenen en països de la Unió Europea (UE), mentre que la incidència de BRCVC en pacients que no pertanyen a la UE és significativament inferior, amb uns valors de 0,39/1.000 admissions (15).

A Espanya, segons els Estudis de Vigilància d'Infecció Nosocomial sobre els pacients ingressats a la UCI (ENVIN) del 2017, la taxa d'incidència global de la BRCVC és de 2,93 episodis/1.000 dies de catèter, essent la tercera infecció nosocomial més freqüent a les UCIs espanyoles (16). En altres unitats d'hospitalització diferents a la UCI, les taxes més elevades s'observen a Hematologia, Nefrologia i Oncologia, sobretot en pacients portadors de LTCVC; amb una incidència de 1,6 episodis/1.000 dies

d'utilització del CVC (2,17,18). Finalment, segons la Societat Espanyola de Medicina Preventiva i Salut Pública (EPINE) de l'any 2017 (19), la prevalença global de BRCVC és d'1,3% en els CVCs.

Un altre aspecte molt important de la BRCVC és l'elevada mortalitat que ocasiona. Als Estats Units es va descriure una mortalitat atribuïble a la BRCVC durant l'any 2002 d'entre el 12 i el 25% (causant més de 30.000 defuncions) (20). Tanmateix, en un estudi realitzat a Espanya entre l'any 2010-2011 (21), es descriu una mortalitat als 7 i 30 dies dels pacients amb candidèmia del 12,8% i del 30,6%, respectivament, incrementant-se notablement en els pacients més greus, com els ingressats a les UCIs (mortalitat del 16.5% als 7 dies i de 47% als 30 dies) (22), en el que es va demostrar que, aproximadament en un terç dels casos, l'origen de la infecció era el CVC (21).

1.3. Microbiologia

Segons el Programa de Vigilància de les Infeccions Nosocomials als Hospitals de Catalunya (VINCat), els microorganismes més freqüents que causen infecció relacionada al catèter són els grampositius (aproximadament 75% dels casos) (23). Principalment l'espècie coagulasa negativa (ECN) d'estafilococs, que representa el 45%, on *Staphylococcus epidermidis* destaca per ser un colonitzador habitual de la pell i les mucoses i, per tant, es veu implicat tant en el moment de la inserció del CVC com en la manipulació d'aquest per part del personal mèdic; essent, amb una prevalença del 90%, l'agent causal de la majoria d'infeccions dels LTCVCs. D'altra banda, *Staphylococcus aureus* representa al voltant del 20% de les infeccions relacionades al catèter i, els enterococs un 9% (20,23,24). En menor freqüència hi ha els gramnegatius, que representen el 20% dels casos (23–25).

Finalment, els llevats i, concretament, les espècies de *Candida* són els agents causals de la resta dels episodis (23); particularment *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* (26). Dins d'aquestes, tot i que *C. albicans* segueix essent l'espècie fúngica

més freqüent aïllada als hemocultius, estudis longitudinals han detectat una tendència a l'increment de les espècies de *Candida no-albicans*, amb proporcions del 45 i 55%, respectivament (21,27). Tanmateix, s'ha descrit que la distribució de les espècies de *Candida* depenen de factors geogràfics i climàtics, de l'exposició prèvia del pacient als antifúngics i de l'epidemiologia del centre hospitalari (21,28–30). Per exemple, *C. parapsilosis* esdevé la segona espècie més prevalent als hospitals del sud d'Europa, Amèrica Llatina i Austràlia; concretament, els aïllats detectats de *Candida no-albicans* als hospitals espanyols són bàsicament *C. parapsilosis* (24.9%), *C. glabrata* (13.4%) i *C. tropicalis* (7.7%) (21,29–31). En canvi, al nord d'Europa, Estats Units i Canadà, és *C. glabrata*, després de *C. albicans*, la que juga un paper més rellevant en aquest tipus d'infeccions (32–34).

2. Patogènia

La patogènia de la infecció associada als CVCs és multifactorial, complexa i implica la colonització prèvia del catèter, la infecció d'aquest i la possibilitat de desenvolupar una disseminació sanguínia.

Les principals vies de colonització d'un catèter són (Figura 1) (35,36):

- Via extraluminal: la flora cutània migra des de la pell cap al lloc d'inserció del catèter. És la via més freqüent (79-90%) (37) dels catèters de curta durada (< de 14 dies) (38–40).
- Via intraluminal: infecció produïda al punt de connexió del catèter vascular com a conseqüència de les manipulacions repetides, per part del personal assistencial, durant els recanvis rutinaris del sistema d'infusió o de l'administració de fàmacs, solucions, nutrició parenteral o productes sanguinis. Aquesta és la via més freqüent (66% dels casos) de les infeccions de LTCVCs (> de 14 dies) (41,42).
- Via endoluminal: a través de la contaminació intrínseca del líquid infós (< 3% dels casos).

- Via hematògena: per disseminació des d'un punt distant d'infecció. Aquesta via d'infecció és molt infreqüent, tot i que es pot veure en determinats pacients amb immunodepressió greu o amb aquells en que es recanvia el catèter a causa d'una infecció sistèmica amb una gran càrrega microbiana en el torrent sanguini.

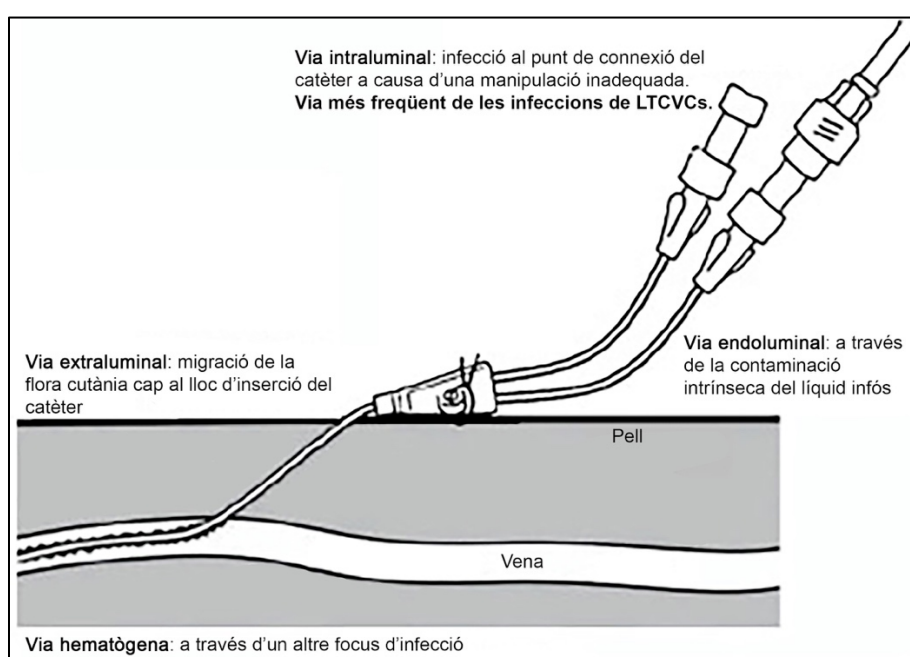


Figura 1. Principals vies de colonització d'un catèter. Imatge modificada de: Christopher J et al. 2002. *Clinical Infectious Diseases* (43).

Tanmateix, existeixen altres factors que faciliten l'adhesió dels microorganismes al catèter i, per consegüent, la seva capacitat de produir una infecció (38): (1) factors relacionats amb el pacient, com serien els extrems d'edats i la immunosupressió, que augmenten el risc d'infecció, (2) factors relacionats amb el microorganisme, estretament lligats amb la capacitat d'aquest per a formar biopel·lícules en el dispositiu (44), (3) factors relacionats amb el catèter (tant la seva composició, el seu tipus o el lloc d'inserció) associant-se amb més risc d'infecció els catèters de polivinil o polietilè *versus* els de tefló o poliuretà (45), els que estan situats a les venes femoral o jugular (46) i els que contenen més llums i múltiples vies, entre altres circumstàncies. D'altra banda,

també s'ha demostrat que l'administració de la nutrició parenteral total pel LTCVC comporta un augment del risc de bacterièmia i/o infecció local (47,48).

2.1. Biopel·lícules

Històricament, la microbiologia ha estudiat els microorganismes en la seva forma de creixement planctònica (creixement lliure). No obstant, en els darrers anys hi ha hagut un canvi de paradigma ja que el *National Institute of Health* d'Estats Units considera que el 80% de les patologies infeccioses humanes estan altament relacionades amb el creixement dels microorganismes en forma sèssil (adherits a una superfície), habitualment anomenat biopel·lícula o *biofilm* (49–54).

Tot i el gran avanç de la medicina moderna, també s'ha demostrat que la introducció d'un material nou a l'organisme genera un nínxol òptim per als microorganismes que creixen formant biopel·lícules, destacant-se entre elles les infeccions en catèters endovenosos i arterials, les pròtesi osteoarticulars i les sondes urinàries, entre d'altres dispositius mèdics d'ús molt freqüent (55). Els microorganismes creixent en biopel·lícules sobre aquests dispositius mèdics, ocasionen infeccions de difícil tractament degut a la presència d'una elevada resistència a les teràpies antimicrobianes i a la capacitat de resistir a les defenses immunitàries de l'hoste (56), causant el fracàs del dispositiu, la necessitat de la seva retirada o, fins i tot, recidives de la infecció després de finalitzar un tractament antimicrobià prolongat (44,57).

L'efecte final és que aquests microorganismes productors de biopel·lícules impacten de manera adversa en la salut d'aquests pacients, prolongant l'estància hospitalària i precisant de múltiples intervencions mèdiques i/o quirúrgiques i, per tant, incrementant el cost econòmic (58).

2.1.1. Definició

Una biopel·lícula es defineix com una comunitat de microorganismes altament estructurada que està adherida a una superfície i immersa en una matriu extracel·lular

(MEC) (ECM de l'anglès *extracellular matrix*) auto produïda (59,60), en el que es desenvolupa un fenotip alterat en relació amb la taxa de creixement i transcripció genètica (55). Els microorganismes productors de biopel·lícules, poden ser d'una sola espècie microbiana o d'una comunitat derivada de múltiples espècies (61), constituint un model de creixement que permet als microorganismes sobreviure en ambient hostil, essent el seu comportament i fisiologia completament diferent de l'estat planctònic.

La formació de la MEC és clau per a aquests microorganismes productors de biopel·lícules, ja que esdevé el suport per a l'estructura tridimensional d'aquesta actuant com a "ciment intracel·lular" (62), i està composta per aigua (98%) i un conjunt de diferents tipus de biopolímers -coneguts com substàncies polimèriques extracel·lulars (SPE) (EPS de l'anglès *extracellular polymeric substances*)- sintetitzats pels propis microorganismes, en el que el component majoritari és l'exopolisacàrid i, en menor quantitat, es troben altres macromolècules com proteïnes, àcid desoxiribonucleic (ADN), lípids i productes diversos de la lisis dels microorganismes (62–68). Dins d'aquesta matriu, els microorganismes s'hi queden adherits i comencen a organitzar-se en colònies amb diferents requeriments metabòlics i diferents microambients de pH, concentració de ions, oxigen, etc (54,69). Aquesta circumstància augmenta l'heterogeneïtat de l'estat fisiològic en el que es troben els microorganismes creixent en *biofilms* (70).

S'ha demostrat que l'arquitectura de la matriu que han auto produït aquests microorganismes formant la biopel·lícula no és sòlida i presenta canals que li permeten establir un vincle amb el medi extern per a realitzar l'intercanvi de nutrients, oxigen i eliminar els metabòlits de rebuig, inclús a les zones més profundes del *biofilm*. Tanmateix, s'ha demostrat que aquesta arquitectura no només depèn del microorganisme que el formen, sinó del substrat on s'adhereix i les condicions de creixement (59,66,71–73). També es poden alliberar microorganismes de la biopel·lícula, que poden viatjar i dipositar-se en nous nínxols de colonització mantenint les mateixes característiques dels microorganismes productors de la biopel·lícula

primària (74). L'alliberació d'aquests microorganismes es pot ocasionar a causa de substàncies secretades pels mateixos, l'activitat de bacteriòfags dins la biopel·lícula o bé per mecanismes físics. El principal avantatge **pels microorganismes de créixer formant un *biofilm* és que representa una estratègia de supervivència, ja que proporciona una protecció enfront l'ambient, resistència a estressos químics o físics, cooperació metabòlica i regulació de l'expressió genètica** (60).

2.1.2. Formació de les biopel·lícules

La formació d'una biopel·lícula és un procés complex que s'inicia amb l'adherència dels microorganismes sobre una superfície i seguint amb una sèrie de fases de desenvolupament: 1) condicionament, 2) adhesió reversible, 3) adhesió irreversible i síntesi de matriu extracel·lular induïda pel *quorum sensing*, 4) maduració i 5) dispersió (75).

Els microorganismes creixen formant una biopel·lícula quan detecten certs paràmetres ambientals, com una disminució o augment de la disponibilitat de nutrients o canvis en l'osmolaritat, pH, tensió d'oxigen i temperatura, que disparen la transició de la forma de creixement planctònica a un creixement en biopel·lícula. A part d'això, l'ambient que desencadena aquesta transició varia d'un microorganisme a un altre (etapa acondicionament de la superfície de la Figura 2) (58). La segona etapa correspon a l'adhesió reversible del microorganisme (etapa adhesió reversible de la Figura 2), pas clau en que intervenen les energies superficials del biomaterial, la cèl·lula microbiana i el medi líquid que les envolta (76). Aquests microorganismes poden adherir-se a la superfície dels dispositius mitjançant factors inespecífics (tensió superficial, hidrofobicitat o forces electrostàtiques) o mitjançant adhesines específiques (68). Tanmateix, s'ha demostrat que la hidrofobicitat de la superfície és la principal força molecular per la seva adhesió al substrat, unint-se més fàcilment als materials hidròfobs (77,78). En aquesta etapa reversible, els microorganismes poden abandonar la superfície per tornar al seu estat planctònic (79).

Posteriorment, a l'etapa 3, es produeix un canvi de l'adhesió reversible a irreversible (etapa 3, adhesió irreversible de la Figura 2), on la interacció dèbil entre el microorganisme i el substrat canvia per un enllaç permanent mitjançat per les petites quantitats de SPE que envolten els microorganismes formadors del *biofilm*. Un cop aquests s'han adherit a la superfície, comencen a dividir-se i les cèl·lules filles s'expandeixen al voltant del lloc d'unió, formant una microcolònia, que s'autoregula mitjançant molècules de *quorum sensing* (sistema de comunicació entre els microorganismes que involucra la regulació i l'expressió de gens específics a través de molècules de senyalització) (61,80–82) i, alhora, comencen a secretar la matriu de la biopel·lícula.

Una de les característiques més importants dels *biofilms* produïts tant de bacteris com de llevats, és la presència i composició d'aquesta matriu extracel·lular (61,66). Convé destacar que la composició de la MEC en soques de *Candida*, varia segons l'espècie. Per exemple, la matriu produïda per *C. albicans* formant biopel·lícules està constituïda majoritàriament de carbohidrats i proteïnes, la matriu de *C. parapsilosis* té altes quantitats de carbohidrats i poques proteïnes, *C. glabrata*, conté altes proporcions d'ambdós i, contràriament, la MEC de les soques de *C. tropicalis* contenen baixes concentracions de carbohidrats i proteïnes (83). Per contra, la MEC dels bacteris creixent en biopel·lícules està formada principalment per carbohidrats i, la majoria, presenten càrrega negativa a causa de la presència de grups carboxils, sulfats o fosfats. La concentració de proteïnes, àcids nucleics i lípids és baixa (62).

S'ha de tenir en compte que, a part de la composició de la MEC, la composició de l'exopolisacàrid també és diferent a cada microorganisme i consisteix en una barreja de carbohidrats neutres i carregats que, a part, poden contenir substituents orgànics o inorgànics (84). En el cas dels llevats productors de biopel·lícules, el polisacàrid també varia segons l'espècie, per exemple, l'exopolisacàrid principal de *C. albicans* és la glucosa (32,2%), mentre que el de *C. tropicalis* és hexosamina (27,5%). Les molècules

de glucosa es troben formant principalment (1,3)- β -D-glucà, el qual no només és el component fonamental de la paret cel·lular, sinó que en algunes espècies també és el carbohidrat més abundant de la MEC. En el cas dels bacteris, dos dels exopolisacàrids més ben caracteritzats de la MEC són l'alginat, produït per *Pseudomonas aeruginosa*, i l'hexosamina poli-N-acetilglucosamina, secretada per *S. epidermidis* i *S. aureus* (85,86). En diversos estudis recents s'ha posat de manifest que inclús un mateix microorganisme, depenent de les condicions ambientals a les que es trobi, pot produir diferents exopolisacàrids com a component de la matriu del *biofilm* (87,88). Per exemple, les soques de *Candida* spp. produeixen exopolisacàrids específics quan creixen formant *biofilms* (66,89), essent qualitativa i quantitativament diferents dels microorganismes que creixen en planctònic (66). Un exemple clar és en soques de *C. albicans*, com s'ha esmentat anteriorment, l'exopolisacàrid principal del seu *biofilm* conté una proporció elevada de glucosa (32,2%) (62), en canvi, quan els microorganismes es troben en creixement planctònic, l'exopolisacàrid principal d'aquests és la mannososa (66,89). Les evidències presentades per Baillie *et al.* (66), van demostrar que aquest fet no succeeix en els bacteris productors de *biofilms*, ja que produeixen els exopolisacàrids amb la mateixa composició que en els cultius planctònics i que rarament hi ha polisacàrids específics únicament del creixement en biopel·lícules. Tot i així, hi ha altres condicions ambientals (composició dels nutrients, temperatura, concentracions d'oxigen i pH) que sí que afecten a la composició de l'exopolisacàrid dels bacteris (88).

L'etapa 4 (etapa de maduració de la Figura 2) consisteix en la maduració d'aquest *biofilm*, que dóna com a resultat una arquitectura complexa, formant unes estructures semblants als bolets (*mushrooms*) amb canals, porus i espais intercel·lulars o microcanals i s'indueixen canvis fenotípics dels microorganismes que permeten l'adaptació al nou entorn per garantir la supervivència dins de la biopel·lícula (per exemple, créixer anaeròbiament en zones profundes). L'arquitectura d'aquesta presenta diferències significatives entre espècies i també de les característiques del substrat al que s'adhereixen i altres aspectes del medi ambient. N'és un exemple clar les

biopel·lícules formades per diferents espècies de *Candida*, ja que *C. albicans* presenta una organització bifàsica, amb una capa de blastopores adherides al substrat, que posseeix una profunditat d'una o dues cèl·lules metabòlicament actives. Per sobre, estan recobertes per una fina capa de MEC que conté un dens agregat de (1,3)- β -D-glucà (similar a la paret cel·lular) i, finalment, sobre aquesta capa se situa una capa abundant d'hifes immerses a la MEC (59,72). Per contra, *C. glabrata* mostra una biopel·lícula formada exclusivament per varies capes de blastòpors, ja que s'ha demostrat que és una soca amb absència total de pseudohifes o hifes (83). Finalment, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* formen una biopel·lícula bifàsica, amb capes basals de blastopores i hifes en diferents proporcions (83).

El potencial de creixement dels microorganismes productors de biopel·lícules està limitat per diferents factors ambientals, com per exemple, la disponibilitat de nutrients a l'ambient, el pH intern, la penetració d'oxigen, etc. La producció de les biopel·lícules de *Candida* spp. es poden diferenciar en 3 fases de creixement: primerenca (0 a 11 hores), intermèdia (12 a 30 hores) i madura (31 a 72 hores) (59).

Finalment, algunes microcolònies es poden despendre de la superfície o alliberar-se de la MEC, per a poder colonitzar noves superfícies i així, tancar el procés de desenvolupament de la formació de la biopel·lícula (etapa 5 dispersió de la Figura 2). La degradació de la MEC és un procés complex que succeeix en dos passos: primerament, els microorganismes s'activen metabòlicament i, posteriorment, s'activa l'expressió dels gens que codifiquen molècules capaces de degradar la matriu extracel·lular. Així doncs, quan s'assoleix una alta densitat de microorganismes a l'interior de la biopel·lícula, al produir-se la manca de nutrients, s'activen els gens que indueixen l'expressió de proteases, nucleases i molècules amb propietats surfactants que solubilitzen els components de la MEC i permeten l'alliberació dels microorganismes del *biofilm* (90).

La capacitat de formar biopel·lícules per les diferents espècies de *Candida* ha sigut estudiada àmpliament, en general *C. albicans* és la que produeix *biofilms* amb major freqüència, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. glabrata* (68).

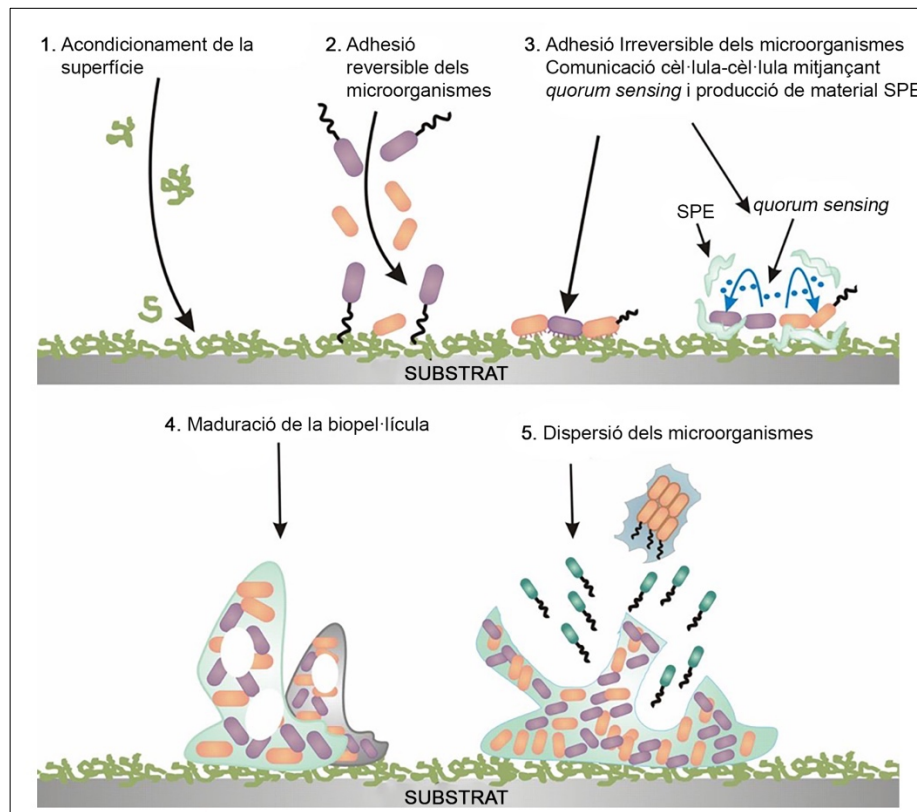


Figura 2. Esquema de les etapes dels microorganismes creixent formant una biopel·lícula sobre un substrat. Imatge modificada de: Chambless JD *et al.* 2006. *Applied and Environmental Microbiology* (91).

2.1.3. Mecanismes de resistència dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules

Els *biofilms* produïts pels bacteris comparteixen moltes característiques amb els dels llevats, entre elles, la que els defineix per de la seva importància és la seva elevada resistència davant dels agents antimicrobians. Aquest fet explica la persistència de les infeccions tot i utilitzar un tractament adequat. S'ha descrit que tan bacteris com llevats creixent en biopel·lícules poden arribar a ser fins a 1000 vegades més resistents als

antimicrobians que els seus homòlegs creixent en forma planctònica (59,92–94). El fenomen de la resistència dels microorganismes creixent en biopel·lícules és complex i multifactorial, tanmateix, s'ha demostrat que segons la fase de creixement en que es troba la biopel·lícula els microorganismes utilitzen uns mecanismes de resistència o uns altres, essent doncs fase-dependents (53). Tot i que els estudis inicials es van basar en l'anàlisi dels **mecanismes de resistència dels microorganismes creixent en forma planctònica, es va demostrar que aquests eren diferents dels que creixien formant biopel·lícules**. Per tant, els estudis de la última dècada s'han centrat en investigar els mecanismes de resistència induïts fenotípicament i específics d'aquests microorganismes formant *biofilms*, com: la matriu extracel·lular, la resposta adaptativa a l'estrès ambiental, l'estat fisiològic alterat, les cèl·lules persistents i la densitat cel·lular. (Figura 3) (1,53,68,95–99):

Matriu extracel·lular: tot i que a l'interior del *biofilm* hi ha gran quantitat d'aigua i soluts de la mida dels antimicrobians, la mobilitat física d'aquests és restringida a causa de que la MEC limita la difusió de l'antimicrobià als microorganismes de les capes més profundes del *biofilm*, fet que els hi proporciona una elevada resistència (96,100,101). Tanmateix, s'ha demostrat que la composició química de la matriu extracel·lular juga un paper clau en la resistència d'aquests microorganismes, ja que segons la seva composició, pot interactuar directament amb els antimicrobians i ocasionar la seva inactivació o segrest per anular la seva activitat (14). Per tant, la MEC actua com a barrera de difusió tant física com química en la penetració dels antimicrobians.

En aquest punt cal destacar que la composició de la MEC de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules és variable segons l'espècie, per tant, la resistència de cada soca pels diferents tractaments dependrà, en part, d'aquesta característica. El DNA extracel·lular i el (1,3)- β -D-glucà, component essencial de la paret cel·lular dels llevats, són dos dels components de la MEC que s'han relacionat més amb resistència de *Candida* spp. quan creix formant biopel·lícules (62,102).

Resposta adaptativa a l'estrès ambiental: la resposta a l'estrès ambiental cada cop està més descrita com un mecanisme de resistència de la població microbiana als antimicrobians. L'activació de respostes d'estrès provoca canvis a la fisiologia del microorganisme que condiciona l'aparició de fenotips específics i que redueix l'eficàcia de les substàncies antimicrobianes (82,97). Per exemple, activació dels gens que codifiquen per bombes d'expulsió o *efflux*, que es troben a la membrana externa i s'encarreguen del transport actiu de les molècules tòxiques (com els antimicrobians) cap a l'exterior dels microorganismes. Una altra resposta adaptativa és la modificació dels components de la paret cel·lular, reduint així la permeabilitat o limitant l'entrada dels antimicrobians a l'interior de la cèl·lula (103,104).

Estat fisiològic alterat: s'ha de tenir molt en compte que factors incloent el pH, la temperatura, l'oxigen disponible i altres estressos ambientals poden alterar l'arquitectura, produint heterogeneïtat fisiològica dels microorganismes dins les biopel·lícules (105,106), per exemple, han de modificar la seva respiració mitocondrial segons les concentracions d'oxigen a les que es troben (107). Això pot provocar que els anticossos, les cèl·lules del sistema immunitari i els antimicrobians afectin de forma diferent a les microcolònies del *biofilm*, tenint menys accés als microorganismes situats a les zones més profundes (98). Com a conseqüència, l'existència d'aquests microambients afecta de forma antagònica a l'acció dels antimicrobians. D'altra banda, a les parts més profundes dels *biofilms* madurs hi ha limitació de nutrients, oxigen, etc., el que provoca un creixement més lent per part dels microorganismes que estan sota aquest microambient (108). Aquest canvi fisiològic pot provocar resistència dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules als antimicrobians.

Cèl·lules persistents o persisters: són microorganismes "adormits" que es caracteritzen per una activitat metabòlica reduïda, l'absència de divisió cel·lular i una alta tolerància als antimicrobians (109–111). La presència d'aquests microorganismes reflecteix, de forma clara, l'heterogeneïtat metabòlica, i és una característica que es manifesta únicament en els microorganismes que creixen formant biopel·lícules, no en

els que creixen en planctònic. Aquests microorganismes solen constituir entre un 0,1-1% de la població de microorganismes productors de *biofilms*, solen aparèixer a causa de l'exposició periòdica dels antimicrobians (112), i fa que siguin els principals causants de les infeccions recurrents en clínica (109).

Densitat cel·lular dels microorganismes: l'activitat dels antimicrobians es veu disminuïda en presència d'una densitat cel·lular elevada, fenomen conegut com "l'efecte inòcul". Els microorganismes dels *biofilms* madurs, mentre estan densament habitats, presenten una heterogeneïtat espacial amb microcolònies i canals d'aigua entremig (59). Amb una alta densitat cel·lular dins del *biofilm*, hi ha cooperació dels microorganismes mitjançant el *quorum sensing*, que fa que responguin mitjançant l'activació de gens de resistència (80,113).

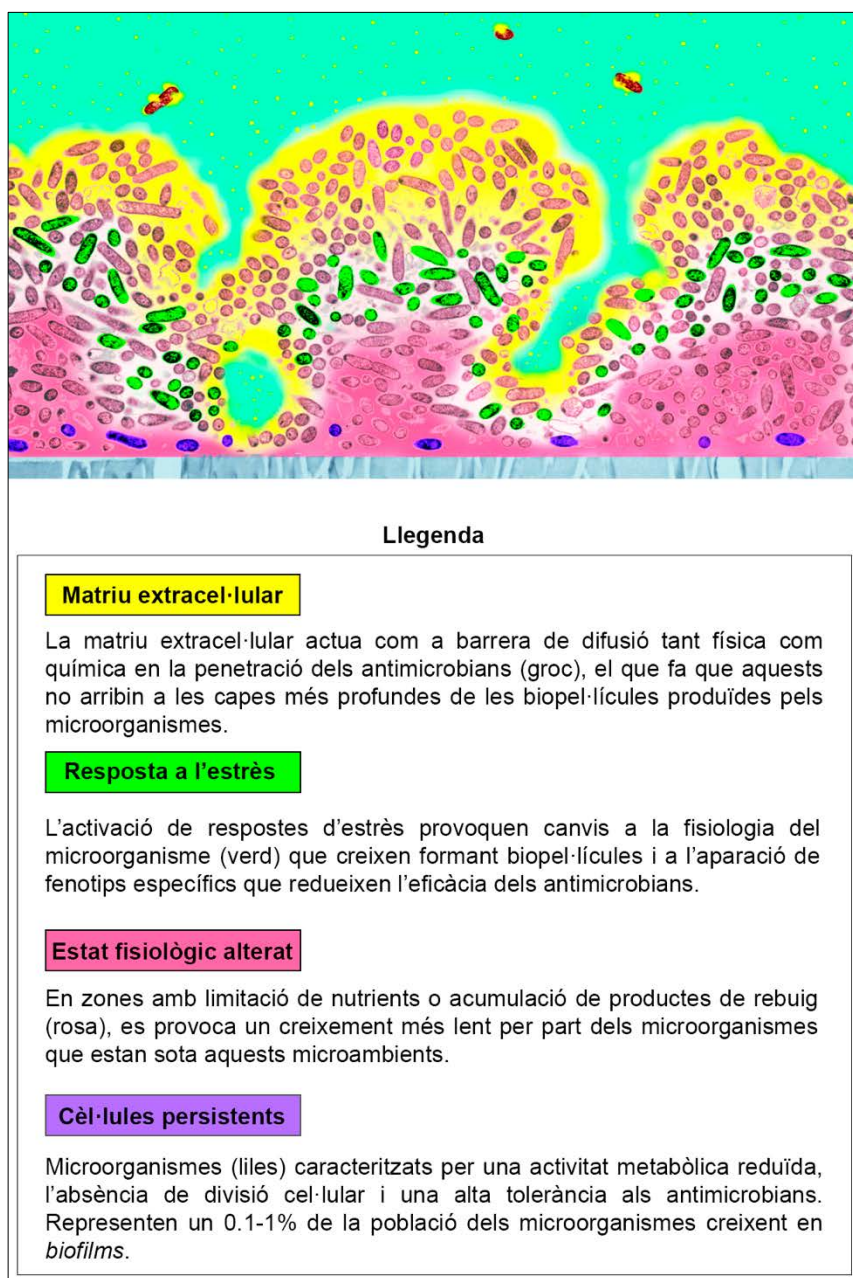


Figura 3. Alguns dels mecanismes de resistència dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules. Imatge modificada de: Chambliss JD *et al.* 2006. *Applied and Environmental Microbiology* (91).

En resum a tot això, els mecanismes de resistència dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules són dependents de la fase de creixement. Les bombes d'expulsió (mecanisme de resposta a l'estrès ambiental), són clarament utilitzades en les fases primerenques i intermèdies de la formació del *biofilm*, abans de la producció de la MEC.

La densitat cel·lular dels microorganismes, a la fase de maduració del *biofilm*, actua com una barrera física. Tot i la producció de *biofilms* densos, quan la penetració de antimicrobià és possible, el fenotip de cèl·lules persistents els assegura la supervivència i, en aquest ambient d'estrès, s'activen proteïnes per a protegir aquests microorganismes. Així doncs, les evidències subratllen que la resistència dels microorganismes quan creixen formant *biofilms* provoquen un fenotip induïble i que forma part d'una sèrie de múltiples vies moleculars que regulen el desenvolupament i la homeòstasis del *biofilm* (53). I que, en els diversos escenaris que s'han descrit, gràcies a totes aquestes característiques es fa difícil el tractament terapèutic d'aquestes infeccions causades per aquests microorganismes.

En aquesta tesi doctoral es presenten els resultats obtinguts en diferents tractaments utilitzats pel segellat de catèter davant de diferents espècies de *Candida* i *S. epidermidis* creixent en biopel·lícules. Per aquest motiu, a continuació s'explicarà detalladament els principals mecanismes de resistència dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules enfront als antimicrobians d'estudi per aquests dos tipus de microorganismes.

2.1.3.1. Mecanismes de resistència de *Candida* spp. que creixen formant biopel·lícules

Ha estat àmpliament demostrat que l'estil de vida de soques *Candida* spp. que creixen formant biopel·lícules, han augmentat dràsticament els nivells de resistència dels agents antifúngics més utilitzats (72,93,114–116). Tot i que el fenotip de la resistència dels microorganismes està més pronunciat a les últimes fases de desenvolupament del *biofilm*, aquesta també pot ser detectada durant els primers minuts o hores des de la seva adhesió a la superfície (117) i, com s'ha demostrat, no està involucrada en l'adquisició de mutacions genètiques, ja que si els microorganismes que formen el *biofilm* es fan créixer en condicions planctòniques, aquests són susceptibles als

antifúngics. Tanmateix, tot i que la resistència dels antifúngics està clarament relacionada amb les vies específiques de la formació dels *biofilms* pels factors comentats amb anterioritat com la densitat cel·lular, les cèl·lules persistents, la producció de MEC, etc., una petita fracció d'aquesta resistència també pot estar ocasionada pels mateixos mecanismes de resistència descrits en les cèl·lules planctòniques. Amb tot això, la resistència de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules és multifactorial, amb diversos mecanismes que actuen de manera coordinada en les diferents fases de creixement del *biofilm* i que contribueixen de manera intrínseca a la resistència antifúngica (53,99). Tot i la dificultat d'eradicació d'aquests microorganismes, els ara dits "nous antifúngics", com per exemple les equinocandines o les formulacions lipídiques de l'amfotericina B, han demostrat tenir eficàcia davant dels llevats que formen aquestes estructures tan complexes (68,72,118).

2.1.3.1.1. Resistència als azols

Els azols han sigut considerats els antifúngics clàssics de referència pels llevats, tanmateix, s'ha demostrat que aquests presenten una activitat disminuïda davant de soques de *Candida* spp. productores de *biofilm* (119). El mecanisme d'acció dels azols deriva de la inhibició de la biosíntesi de l'ergosterol, produint d'aquesta manera una alteració a la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules fúngiques. S'ha demostrat que els mecanismes de resistència intrínseca als azols descrits en *Candida* spp. creixent en biopel·lícules, estan relacionats amb el paper de les bombes d'expulsió, la variació dels esterols de la membrana, l'impacte de la densitat cel·lular, la formació de la matriu extracel·lular, les cèl·lules persistents i la influència de diferents mecanismes de resposta a l'estrès (53,99,120).

Tot i que les bombes d'expulsió juguen un paper fonamental en la resistència dels azols en soques de *Candida* spp. creixent en planctònic, el seu paper en la resistència associada a *biofilms* varia (53). Durant les fases primerenques de la formació dels

biofilms, aquestes augmenten la seva activitat de forma transitòria, en canvi, en els microorganismes amb creixement planctònic el que succeeix és que es produeix una resistència adquirida, produïda per una mutació genètica com a resultat de l'increment de l'activitat de les bombes. En els diferents estudis centrats en aquest tema, es van mutar els gens que codifiquen per aquestes bombes d'expulsió a diferents etapes del desenvolupament del *biofilm* (121,122). D'aquesta manera, van poder demostrar que durant les fases més primerenques de la formació de les biopel·lícules, els microorganismes es tornaven hipersensibles als azols, contràriament al que passava a les fases madures, ja que aquesta no millorava. Així doncs, aquests estudis van suggerir que les bombes d'expulsió contribueixen a la resistència als azols a les fases primerenques tot i que no és un mecanisme determinant de la seva resistència (123). Aquest mecanisme també es va poder demostrar en soques de *C. glabrata* i *C. tropicalis* (53,124), i s'ha vist que les equinocandines són les úniques que no es veuen afectades per aquest tipus de resistència (53,125).

Pel que fa referència a la composició dels esterols de la membrana, es va demostrar que les soques de *C. albicans* creixent, tant de forma planctònica com en biopel·lícules, a les 6 hores de creixement tenien nivells similars d'ergosterol. En canvi, a les fases finals de la formació del *biofilm*, els nivells eren significativament menors, essent reduïts en un 41% a la fase intermèdia i en un 50% a la fase madura respecte les fases inicials (122). Això està causat perquè els microorganismes dels *biofilms* madurs són menys dependents de l'ergosterol per mantenir la fluïdesa de la membrana (122). Aquest efecte limita potencialment l'eficàcia de tots els fàrmacs amb mecanisme d'acció sobre l'ergosterol, com els azols i l'amfotericina B (122). En resum, l'alteració dels esterols de la membrana és un mecanisme clau de la resistència a les fases intermèdia i madura de *Candida* creixent en *biofilms* (121,122).

L'impacte de la densitat cel·lular sobre la resistència de *Candida* spp. va ser descrit per Perumal *et al.* (126), que van demostrar l'efecte inòcul amb elevada resistència als azols, quan els microorganismes del *biofilm* estaven exposats a altes densitats cel·lulars. En general, s'ha descrit les soques de *C. glabrata* productores de biopel·lícules posseeixen una major densitat de cèl·lules comparat amb les de *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* (97,127), fet que explicaria la usual elevada resistència d'aquestes soques pels azols i l'amfotericina B (128–130).

Una de les característiques principals dels microorganismes creixent en *biofilms* esdevé en la formació de la matriu extracel·lular, que conté el (1,3)- β -D-glucà, component essencial de la paret cel·lular dels llevats. Nett *et al.* (131), van estudiar com afectava el material de la matriu sobre cèl·lules en creixement planctònic, i van observar que l'addició d'aquestes sobre la matriu, mimetitzaven el fenotip de resistència antimicrobiana de les cèl·lules productores de *biofilm*, suggerint que la MEC és capaç d'unir-se o segrestar les diferents famílies d'antifúngics (99,132,133). S'ha demostrat que determinades espècies de *Candida*, com *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*, utilitzen aquest mecanisme de resistència de segrest dels antifúngics (134).

Tot i que el mecanisme de *C. albicans* per passar a cèl·lula persistent no ha sigut clarament definit, se sap que aquest implica canvis tant a la membrana com a la paret cel·lular (135), i exhibeix tolerància a diferents classes d'antifúngics com els azols i l'amfotericina B (112,136). Tanmateix és un efecte espècie i soca depenent, ja que algunes soques formadores de *biofilms* freqüentment contenen subpoblacions de cèl·lules persistents, com *C. albicans* i *C. krusei* i, en canvi, aquestes no s'han observat en *C. glabrata* (137).

A causa de l'acció multifactorial de tots aquests mecanismes de resistència, **les cèl·lules creixent en biopel·lícules són 1.000 vegades més resistents als azols que**

les seves homòlogues planctòniques, resultant una opció terapèutica inefectiva per a tractar les infeccions produïdes per soques de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules (53)(138).

2.1.3.1.2. Resistència a l'amfotericina B

Els antifúngics de la família dels poliens, com l'amfotericina B i les seves formulacions, presenten el major espectre d'acció entre els agents disponibles pel tractament de les infeccions fúngiques. El seu mecanisme d'acció és la unió de manera intercalada amb l'ergosterol de les membranes fúngiques, produint canals en les mateixes que permeten la sortida al medi extracel·lular de ions monovalents intracel·lulars, particularment potassi, i de petites molècules. Finalment, el canvi d'osmolaritat que es produeix com a conseqüència d'això és el responsable últim de la lisis de la cèl·lula (139). És un fàrmac amb una toxicitat potencialment remarcable, ja que, al actuar sobre l'ergosterol podria interactuar amb la membrana de les cèl·lules eucariotes. Tanmateix, presenta una major afinitat per l'ergosterol dels llevats que pel colesterol de les cèl·lules dels mamífers. Pel que fa referència als mecanismes de resistència de l'amfotericina B, alguns són els mateixos que en els descrits pels azols, com els involucrats amb la reducció de l'ergosterol de les últimes fases de la formació del *biofilm*, la producció de la MEC amb contingut de (1,3)- β -D-glucà, que reté aquest fàrmac i, per tant, redueix l'exposició de les cèl·lules del *biofilm* a aquest (132) i la presència de cèl·lules persistents en algunes espècies o soques de *Candida* (99). Tanmateix, un altre mecanisme de resistència identificat en la resistència antifúngica i que, sorprenentment, no mostra cap impacte en l'activitat dels azols, està involucrat en el DNA extracel·lular que conté la MEC (102), ja que diferents estudis han demostrat que tractar els microorganismes creixent en *biofilms* amb DNAses, augmentava l'activitat de certs antifúngics com els poliens i les equinocandines (102). Tot i això, no es té clar quin és el mecanisme pel qual el DNA de la MEC contribueix a la resistència d'aquests antifúngics.

L'estat fisiològic és un dels mecanismes típics de resistència dels microorganismes productors de biopel·lícules, en que la taxa de creixement és un important modulador d'aquests microorganismes, ja que un creixement lent se sol associar amb canvis a la envolta cel·lular, fet que normalment afavoreix la resistència als antibacterians (140). D'altra banda, Baillie *et al.* (93) van demostrar que *C. albicans* creixent en *biofilms*, exhibien nivells similars de la resistència a l'amfotericina B, tot i exposar-los a diferents rangs de taxes de creixement, suggerint que aquesta no juga un paper rellevant a la resistència d'aquests microorganismes. Per contral, van demostrar que si aquest creixement es produïa en condicions anaeròbiques o amb nivells reduïts de glucosa o ferro, és a dir, amb factors diferents de l'estat fisiològic, aquesta resistència sí que es veia augmentada (141,142).

També és rellevant destacar que s'està donant cada cop més importància a les superfícies on s'adhereixen els microorganismes i es desenvolupen els *biofilms*, ja que alguns autors com Baillie *et al.* (66) van demostrar que soques *C. albicans* productores de *biofilms* i formades sobre catèters de polivinil de diferents proveïdors, tot i ser del mateix material, mostraven diferències significatives respecte la sensibilitat a l'amfotericina B, suggerint que alguna diferència amb el contingut o la composició del plastificant pot generar resistències als antimicrobians de manera diferent i, aquesta també pot sorgir com a conseqüència d'una expressió genètica molt específica i induïda per la superfície on s'adhereixen els microorganismes.

Amb aquests mecanismes de resistència i, depenent de l'estat de maduració del *biofilm*, **s'ha vist que l'amfotericina B pot ser fins a 8 vegades més resistent en els microorganismes creixent en biopel·lícules que les homòlogues planctòniques** (143). Contràriament als mecanismes de resistència descrits en *Candida* spp., per a l'amfotericina B no hi ha estudis sobre la resistència de les formulacions lipídiques d'aquest fàrmac.

2.1.3.1.3. Resistència a les equinocandines

Existeixen diversos estudis a favor de l'ús de les equinocandines com a tractament conservador per a l'eradicació de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules, ja que disposen d'una alta eficàcia anti-*biofilm* independentment de l'estadi de maduresa d'aquest (144). Les equinocandines (caspofungina, micafungina i anidulafungina) actuen inhibint la síntesi del (1,3)- β -D-glucà, component essencial de la paret cel·lular. Els mecanismes de resistència de la *Candida* spp. al créixer en biopel·lícules i enfront les equinocandines han sigut poc estudiats. Hi ha autors que recolzen la idea que la composició de la MEC genera resistència a aquesta família d'antifúngics (133), tant pel contingut de DNA extracel·lular de la MEC com pel (1,3)- β -D-glucà. Tanmateix, en comparació amb els altres antifúngics disponibles, aquestes tenen més activitat davant d'aquests microorganismes, ja que al inhibir la síntesi del (1,3)- β -D-glucà, possiblement es perjudica la composició de la matriu en sí (72).

La inhibició del (1,3)- β -D-glucà a causa de l'exposició de les equinocandines, genera un estrès cel·lular que indueix una varietat de mecanismes de protecció pels microorganismes. Aquesta resposta adaptativa genera una subpoblació de cèl·lules persistents que eleva les concentracions mínimes inhibidores de les equinocandines (145). De la mateixa manera, alguns articles han demostrat un efecte paradoxal *in vitro*, especialment de caspofungina i micafungina, quan aquestes s'utilitzen a altes concentracions (144,146,147) produït per l'increment de la quitina de la paret cel·lular com a resultat a una resposta d'estrès causada per l'antifúngic (148). Per contra, l'anidulafungina és l'equinocandina que menor efecte paradoxal ha demostrat fins al moment (149). **Comparades amb les cèl·lules planctòniques, les cèl·lules creixent en biopel·lícules són de 2 a 20 vegades més resistents a les equinocandines** (133).

2.1.3.2. Mecanismes de resistència d'ECN d'estafilococs que creixen formant biopel·lícules

A causa de la seva predisposició a la formació de *biofilms* en els dispositius i, l'increment demostrat de les concentracions mínimes inhibidores dels "antibiòtics vells", fa que **aquestes soques, associades a la formació de biopel·lícules, siguin de 10 a 1000 vegades més resistents als antibiòtics que les homòlogues planctòniques** (84), essent necessari estudiar nous antibiòtics per tractar aquest tipus d'infeccions (150). Així doncs, la resistència als microorganismes de les ECN d'estafilococs creixent en biopel·lícules és complexa i amb múltiples factors involucrats com fenotips dependents de soca, modificació del contingut en els lípids i les proteïnes de l'envolta cel·lular (151).

2.1.3.2.1. Resistència a la vancomicina

Actualment, la vancomicina és el fàrmac d'elecció pel tractament de les infeccions causades per ECN d'estafilococs resistents a la meticil·lina. El seu mecanisme d'acció consisteix en impedir la formació d'enllaços creuats (*cross-linking*) entre els aminoàcids del peptidglicà i la seva unió als precursors (D-Ala-D-Ala) de la paret cel·lular dels bacteris, inhibint la síntesi d'aquestes. El resultat final és una alteració de la permeabilitat de la paret cel·lular dels bacteris que els fa incompatibles amb la vida. Pel que fa referència a la seva resistència, s'ha demostrat que està estretament lligada amb la composició de la MEC i l'alta densitat cel·lular.

S'ha demostrat que, possiblement, els components de la MEC ocasionen el segrest d'antibiòtics com la vancomicina a causa del seu alt pes molecular (1.450 daltons), disminuint la penetració d'aquests a través dels microorganismes productors de *biofilms* (152), la qual cosa comporta una reducció de la seva exposició a aquests bacteris i, en conseqüència, una disminució aparent de l'eficàcia antibiòtica (84,153–155). Amb els diferents estudis publicats sobre el tema, s'ha suggerit que els glicopèptids, com la vancomicina, poden no ser l'antibiòtic òptim per a tractar infeccions produïdes per biopel·lícules (152).

2.1.3.2.2. Resistència a la daptomicina

La incorporació de la daptomicina en els últims anys ha suposat un replantejament a la cerca d'una nova i millor antibioteràpia per aquestes infeccions de difícil tractament. El seu mecanisme d'acció consisteix en la seva unió (en presència de calci) a les membranes de les cèl·lules, tant en fase de creixement com en estacionària, causant una despolarització i conduint a una ràpida inhibició de la síntesi de proteïnes, ADN i àcid ribonucleic (ARN), resultant la lisis de la cèl·lula bacteriana (156,157). Tot i que la daptomicina presenta un pes molecular més alt que la vancomicina (1.619 *versus* 1.450 daltons, respectivament), fet que ens fa pensar que aquesta podria presentar més dificultat per penetrar a l'interior de la biopel·lícula, s'ha demostrat just el contrari, que la difusió de l'antibiòtic cap a l'interior de biopel·lícula dels ECN d'estafilococs és molt millor, fet que podria ser degut a les propietats fisicoquímiques de la MEC. Alguns treballs han intentat correlacionar aquest fet mitjançant estudis sobre la hidrofobicitat o la càrrega dels antibiòtics, però aquests fets no han pogut ser demostrats (152). Tanmateix, sí que s'ha descrit que els àcids grassos C₁₀, que formen part de la daptomicina, ajuden a la penetració d'aquest antibiòtic a les capes més profundes dels *biofilms* madurs (158,159). A causa del seu mecanisme d'acció en tres punts diferents al de la resta dels antibiòtics, s'ha vist dificultada, pel moment, l'aparició de resistències. Per aquest motiu, la daptomicina pot resultar una opció vàlida en el tractament de les infeccions causades per grampositius, sobretot, quan s'associen a infeccions de les soques creixent en biopel·lícules.

3. Tractament

3.1 Tractament de les infeccions relacionades als LTCVC

Per a determinar l'acció terapèutica a utilitzar en un pacient amb una infecció relacionada amb un LTCVC, s'han de tenir en compte diversos factors com: la situació clínica del pacient, la presència de signes locals d'infecció, la necessitat del LTCVC, el tipus de catèter, si hi ha disponibles altres accessos venosos alternatius, si és portador d'alguna pròtesi, el microorganisme causal i d'altres factors menys rellevants (13).

Davant la sospita d'una infecció relacionada amb un LTCVC, les guies de l'*Infectious Diseases Society of America* (IDSA) (13), recomanen, com a prioritari, l'inici de teràpia empírica sistèmica i la retirada immediata del mateix (13,160), amb l'objectiu d'obtenir una millora clínica del pacient, al retirar el focus d'infecció (20). El principal risc que pot comportar la no retirada del LTCVC, és una major freqüència de bacterièmia recurrent i possibles infeccions metastàtiques (13)(37).

No obstant, les recomanacions de la retirada del LTCVC no sempre s'adapten a les necessitats dels pacients, ja que en alguns casos aquesta opció no és possible, ja sigui per la seva dificultat d'inserció, el cost i/o les males condicions del pacient, determinant que la seva retirada sigui altament indesitjable. Més concretament, en pacients amb trombopènia greu amb risc de sagnat, amb dificultat i risc de trobar altres accessos vasculars, amb necessitat de preservar altres accessos vitals pel pacient, amb necessitat de nutrició parenteral a llarg termini causada pels pacients amb síndrome de l'intestí curt o síndrome de malabsorció, o quan la situació del pacient és crítica o amb curta esperança de vida (26). En pediatria també és freqüent la necessitat de mantenir el LTCVC davant la dificultat de canalització d'una nova via (a causa del diàmetre dels accessos vasculars) i amb l'objectiu de preservar-los pel futur en cas de pacients crònics (161). D'altra banda, tot i que retirar un LTCVC sol ser un procediment quirúrgic senzill, s'ha descrit que en el 16% dels casos es produeix certa dificultat (162), essent finalment impossible en un 2% dels pacients (163,164).

S'ha demostrat que només en un 14-25% dels LTCVC que es retiren per sospita d'infecció, aquesta s'acaba confirmant (165,166). Per tant, és necessari assegurar al màxim el diagnòstic d'infecció relacionat amb el LTCVC abans d'una retirada innecessària i, s'ha de sospesar el risc/benefici que això comportaria, ja que la retirada i la necessitat de la inserció d'un nou dispositiu podria plantejar notables dificultats, a part del seu cost econòmic associat (167,168).

Així doncs, pel maneig d'infeccions relacionades amb els LTCVC s'ha de tenir en consideració tres aspectes bàsics: (i) si la infecció és local (porta d'entrada del dispositiu) o sistèmica (hemocultius positius), (ii) si és una infecció complicada o no i (iii) l'etiologia microbiana (Figura 4).

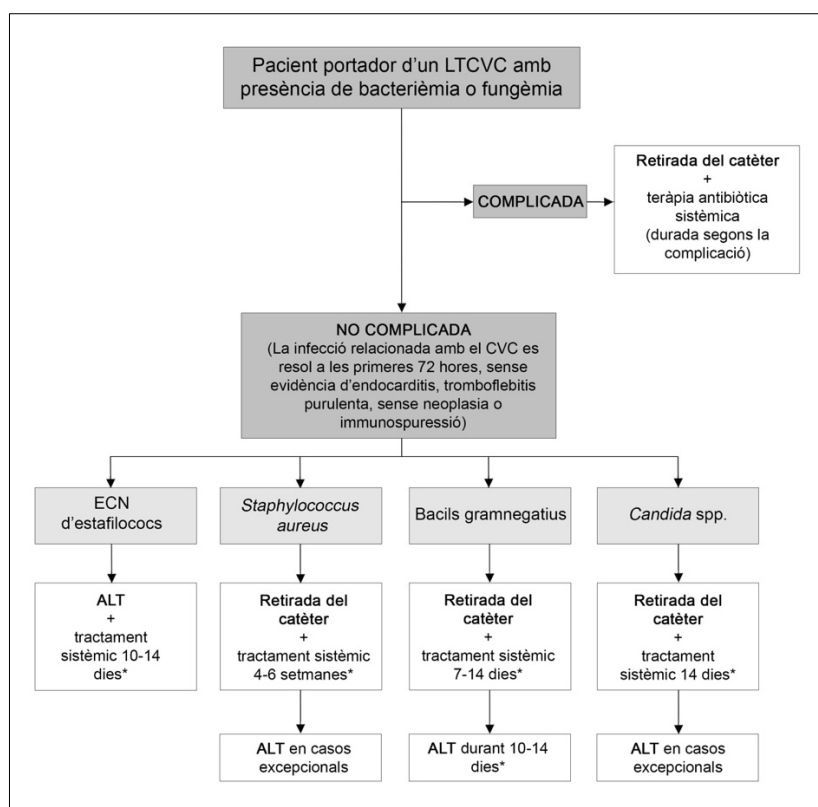


Figura 4. Maneig de pacient amb infecció relacionada a catèter venós central de llarga durada. *hemocultiu recomanat cada 72 hores des de l'inici del tractament conservador. Quan el resultat sigui positiu, el catèter s'haurà de retirar. LTCVC, *long-term central venous catheter*; ECN, espècie coagulasa negativa; ALT, *antimicrobial lock technique*. Imatge modificada de: Mermel LA *et al.* 2009. *Clinical Infectious Diseases* (13).

3.1.1. Estratègia de retirada del catèter

Quan un pacient presenti infeccions complicades, sempre s'ha de procedir a la retirada del LTCVC, independentment de l'etiologia del microorganisme, ja sigui en el cas d'infecció local: presència d'abscess a l'extrem distal (reservoritis) o al llarg del trajecte subcutani (tunelitis), com en el cas d'infecció sistèmica complicada: persistència de la febre o hemocultius positius a les 72 hores després de l'inici del tractament empíric, xoc sèptic, tromboflebitis o infeccions metastàtiques (embolismes a distància, endocarditis, osteomielitis, etc.). En aquests casos, després de la retirada del LTCVC s'ha d'administrar tractament antimicrobià durant 4-6 setmanes i fins a 8 en el cas de sospita d'osteomielitis (13,25,37).

Tot i que es decidís no retirar de manera immediata el catèter, un cop coneguts els resultats dels primers hemocultius, en cas de que hi hagi persistència de la bacterièmia o fungèmia després de les 72 hores del tractament antimicrobià apropiat, o que aquesta sigui causada per microorganismes associats a una taxa elevada de complicacions o sèpsies greus (*S. aureus* o *Candida* spp.) (169,170), també està recomanada la seva retirada (1,13). No obstant, si la etiologia és deguda a un d'aquests microorganismes, es pot valorar realitzar el segellat del catèter, en cas de que la retirada no sigui possible pels fets comentats anteriorment (no disponibilitat d'un altre accés vascular, coagulopaties, necessitat d'hemodiàlisi, etc.). En el cas dels bacils gramnegatius, tot i que el percentatge d'eficàcia d'una teràpia conservadora en cas de que no hi hagi complicacions, és del 87-95% (171–173), en casos d'infecció per microorganismes com *P. aeruginosa*, les guies recomanen la retirada del dispositiu i tractament durant 7-14 dies (13). Tanmateix, en un estudi prospectiu observacional realitzat per Funalleras *et al.* (172), van demostrar el 95% de curació de 15 casos d'infecció del LTCVC per *P. aeruginosa*.

3.1.2. Estratègia conservadora del catèter

Segons les guies IDSA del 2009 (13), en els casos de bacterièmia relacionada al LTCVC sense complicacions sistèmiques ni signes greus d'infecció en el punt d'inserció i, en pacients amb estabilitat hemodinàmica, es podria considerar el tractament conservador mitjançant la tècnica del segellat antimicrobià associat a un tractament sistèmic. L'estratègia de tractament alternatiu per a l'esterilització del catèter sense necessitat de retirar-lo es podria aplicar en infeccions de LTCVC causades per qualsevol microorganisme sempre i quan es disposi d'un fàrmac bactericida o fungicida apropiat. Tot i que en *S. aureus* i *Candida* spp., les guies recomanen que l'ús del tractament conservador només hauria de ser aplicat en condicions excepcionals en que la retirada del dispositiu no fos possible i la utilització del catèter resultés essencial (13,25).

De totes maneres, sempre que s'intenti tractament conservador, s'ha de considerar cada cas de manera individualitzada (situació del pacient i microorganisme aïllat) i, un cop iniciat el tractament, fer sempre una re-avaluació a les 72 hores des de l'inici. En cas de que els hemocultius de sang perifèrica a les 72 hores segueixin essent positius, el catèter s'haurà de retirar.

3.2. Tractament utilitzant la tècnica de l'*antimicrobial lock*

El concepte del segellat antimicrobià (ALT de l'anglès *antimicrobial lock technique*) consisteix en instil·lar altes concentracions d'antimicrobians a la llum del catèter durant un cert període de temps fins a assolir l'esterilització/curació d'aquest. El propòsit d'aquesta tècnica és poder evitar la retirada del LTCVC i, d'aquesta manera disminuir el risc, temps i cost associat amb aquesta i amb la reinserció d'un nou dispositiu (25). Tanmateix, proporciona avantatges com la reducció de la toxicitat i efectes adversos del tractament, una major eficàcia davant microorganismes creixent en biopel·lícules, una menor selecció de microorganismes resistents i, finalment, el fet que es pot administrar el tractament de manera ambulatoria (25,174).

S'ha de tenir present que la teràpia local del catèter utilitzant l'ALT, s'ha de realitzar en combinació amb un tractament antimicrobià sistèmic (13,25).

Els antimicrobians haurien de ser administrats a concentracions de 100 a 1000 vegades més elevades que la concentració mínima inhibidora, i amb un volum total de la solució que ompli tota la llum del catèter (generalment 2-5 mL) (119).

Tot i que la durada òptima del tractament del segellat encara no ha estat del tot establerta, en els estudis publicats fins al moment i les guies IDSA del 2009, recomanen que sigui durant 10-14 dies segons el microorganisme a tractar, amb recanvis de la solució del segellat cada 12-24 hores; depenent de la necessitat de l'accés vascular (13,25,175). En el cas de que la permanència diària del segellat hagi de ser menor a 12 hores, alguns experts recomanen utilitzar antimicrobians d'activitat concentració-depenent. Tanmateix, s'ha demostrat que el canvi cada 48-72 hores també és segur (172).

A part de la necessitat de l'ús d'antimicrobians que penetrin als *biofilms* i arribin a altes concentracions *in situ*, un altre factor determinant de l'eficàcia del tractament és l'estabilitat de les solucions antimicrobianes utilitzades, ja que per evitar la trombosi del catèter, és necessari barrejar aquestes amb un anticoagulant (habitualment amb 10-100 Unitats Internacionals (UI) d'heparina) (13,176,177). Diversos treballs *in vitro* han demostrat la compatibilitat i estabilitat de diferents antibiòtics (vancomicina, daptomicina, teicoplanina, varis betalactàmics i aminoglucòsids) conjuntament amb solucions d'heparina de l'ordre de 100 fins a 5.000 UI/mL, essent actius un mínim de tres dies a 37°C (178–182). Pel que fa referència als antifúngics, l'estabilitat i compatibilitat de l'heparina amb aquests antimicrobians no ha sigut extensament estudiada (183). Fluconazol és l'únic azol del que s'ha obtingut informació i no se n'han reportat incompatibilitats durant 24 hores (183). L'amfotericina B ha demostrat ser compatible amb heparina a concentracions de 5.000 UI/mL durant 72 hores (183). Pel que fa

referència a les equinocandines, hi ha pocs estudis al respecte i aquests es centren més amb la caspofungina i la micafungina. S'ha reportat que la caspofungina pot precipitar en concentracions d'heparina de 100 UI/mL (mostrant precipitats en només 4 hores) (183,184). Tot i això, estudis clínics que s'han realitzat de caspofungina amb concentracions de 200 UI/mL d'heparina no han mostrat incompatibilitats (185,186). D'altra banda, s'ha demostrat que la micafungina és físicament estable durant 24 hores a 37°C (183).

Finalment, la bibliografia al respecte posa de manifest que les taxes d'èxit relatives a la conservació del catèter origen de la infecció són variables i poden dependre, d'entre altres factors, del tipus de microorganisme implicat i de la teràpia aplicada (187). Per tant, s'han de tenir molt presents les característiques antimicrobianes del tractament escollit pel segellat del catèter, ja que una acció ràpida i una alta penetració al *biofilm* són claus per a l'eradicació dels microorganismes.

En aquesta tesi doctoral es presenten els resultats obtinguts en ALT en infeccions produïes per diferents espècies de *Candida* i per *S. epidermidis*. Per aquest motiu, a continuació s'explicarà detalladament quina és la teràpia actual d'ALT més recomanada per aquests dos tipus de microorganismes.

3.2.1. Antibioteràpia ALT de les infeccions relacionades amb els catèters produïdes per *Candida* spp.

De forma general, en les infeccions per *Candida* spp. està indicada la retirada del dispositiu i tractament sistèmic durant 14 dies (després del primer hemocultiu negatiu) sempre que sigui possible, ja que mitjançant la tècnica del segellat del catèter la incidència de complicacions és major si es decideix una actitud conservadora (13,188). No obstant, alguns autors han descrit que l'eficàcia d'aquesta pràctica no ha pogut ser demostrada en alguns subgrups de pacients (189,190) i que, quan el risc de

reemplaçament és major que el benefici, seria útil disposar d'un antifúngic capaç d'eradicar el *biofilm* del dispositiu sense necessitat de retirar-lo (191).

Tot i que encara no s'ha establert quina és la teràpia òptima per l'ALT en infeccions per *Candida* spp. i estudis antics amb antifúngics tradicionals no obtinguessin bons resultats, treballs més recents han demostrat que les formulacions lipídiques d'amfotericina B, les equinocandines i l'etanol semblen ser les estratègies més prometedores (72,119,147,192–194). Hi ha estudis clínics que demostren una bona eficàcia, amb una curta durada hospitalària i baixa mortalitat, quan les infeccions relacionades amb els catèters per *C. albicans* s'han tractat amb equinocandines o amfotericina B liposomal (LAmB) (195). Tot i així, no tots els pacients responen igual als tractaments (pel nivell de formació del *biofilm*, perquè segons la composició de la MEC de cada soca aquestes responen diferent als antifúngics, etc.) i, per tant, són necessaris més estudis per maximitzar l'activitat antifúngica davant de soques de *Candida* spp. i poder millorar el seu pronòstic.

3.2.1.1. Segellat amb azols

Com s'ha comentat anteriorment, els estudis disponibles sobre el tema suggereixen que els tractaments del segellat amb azols no són eficaços en l'eradicació dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules de les diferents espècies de *Candida*. S'han realitzat diversos estudis per avaluar l'efecte de diferents azols (fluconazol, intraconazol i voriconazol) en soques de *C. albicans* amb la formació de *biofilms* madurs i desenvolupades sobre diferents tipus de substrats, ja sigui en superfícies de poliestirè, catèters de silicona, etc (196,197). Tot i utilitzar altes concentracions d'aquests fàrmacs i una durada del segellat prolongada (24 hores) amb repeticions durant 7 dies, no va ser possible l'eradicació total del microorganisme en els catèters (197) i, en la majoria dels casos no van ser capaços d'inhibir més del 40% dels microorganismes en les diferents fases de maduració (59,72,143,196,198–202).

Tanmateix, aquests fàrmacs han sigut testats en nombroses soques d'espècies diferents a *C. albicans* productores de *biofilms* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*) i, l'eficàcia obtinguda ha sigut la mateixa.

Els estudis *in vivo* que hi ha sobre el tema són consistents amb els resultats *in vitro* i, a causa del fracàs terapèutic en la majoria d'aquests (203), no hi ha evidències clíniques que permetin utilitzar la tècnica del segellat del catèter amb azols.

3.2.1.2. Segellat amb amfotericina B

La majoria dels estudis actuals sobre l'eficàcia d'amfotericina B (AmB) en ALT es basen en resultats de AmB deoxicolat (dAmB) i formulacions lipídiques d'amfotericina B, com complexos lipídics d'amfotericina B (ABLC) i LAmB (198). Diferents estudis han comparat l'eficàcia de solucions amb azols o amb dAmB. En ells es va demostrar que, a diferència dels azols, al cinquè dia de tractament la dAmB era capaç d'eradicar *biofilms* madurs (5 dies) de *C. albicans* i *C. parapsilosis* (197). Tot i aquests resultats prometedors, Fiori *et al.* (196) van realitzar el mateix tipus d'estudis amb un gran nombre de soques de *Candida* de diferents espècies creixent sobre silicona, entre elles *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* i *C. krusei* i van demostrar que, tot i l'eficàcia demostrada anti-*biofilm* d'aquest tractament, l'activitat de la dAmB era limitada i depenent de soca. Arrel d'aquests resultats, es va començar a comparar l'eficàcia de la dAmB amb les formulacions lipídiques, com ABLC, en que es va demostrar una eficàcia major d'aquestes últimes davant soques de *C. albicans* i *C. parapsilosis* (72). Posteriorment, diferents autors es van focalitzar en altres formulacions com la LAmB; demostrant una major eficàcia eradicant soques de *C. albicans* i *C. glabrata* creixent en biopel·lícules d'una manera dosi-depenent i en un menor temps d'exposició a aquest fàrmac (< 4 hores), ja que penetrava més fàcilment en els microorganismes de dins la biopel·lícula (201,204,205). Pel que fa referència a altres soques de *Candida*, s'ha pogut observar que l'efecte de la LAmB sobre *C. parapsilosis* presenta una eficàcia més limitada (194).

Els models animals realitzats sobre el tema, han estudiat el segellat antifúngic en soques de *C. albicans*. Shuford *et al.* (206) van realitzar un estudi comparador entre la dAmB i la caspofungina en *C. albicans* i van demostrar que, als 7 dies de tractament, la caspofungina era més eficaç en l'eradicació d'aquests microorganismes. En un altre model on s'utilitzava l'ABLC com a tractament pel segellat del catèter en una soca de *C. albicans* (207), es va reportar eradicació de la colonització en el 100% dels catèters tractats durant 7 dies. Finalment, un estudi va demostrar que utilitzant la LAmB, en períodes més curts de segellat (8 hores) durant 7 dies, era suficients per esterilitzar els catèters infectats amb *C. albicans* (203).

La majoria de les evidències clíniques de l'ALT sobre amfotericina B són amb les formulacions dAmB i LAmB. Pel que fa referència a la dAmB, aquest s'ha utilitzat a una concentració de 2,5 i 5 mg/mL i en infeccions causades per soques de *C. albicans*, *C. glabrata* i un cas de *C. parapsilosis*. En els pacients amb infeccions al catèter per *C. albicans* i *C. parapsilosis*, hi va haver una curació de tots els pacients als 3, 4 i 6 dies de segellat (208–210). Per contra, en les infeccions causades per *C. glabrata*, la taxa de curació va ser inferior, amb recurrències en el 50% casos reportats (209,211). Pel que fa referència a la LAmB utilitzada pel segellat en clínica, s'han realitzat teràpies d'ALT en alguns pacients tractats amb dosis de 2,67 mg/mL i aquesta ha tingut un èxit de 7/8 pacients en soques de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* (193,212). Tanmateix, un estudi pilot realitzat amb pacients pediàtrics i utilitzant la LAmB a dosi de 2 mg/mL com a ALT, va demostrar inicialment una curació del catèter del 77% entre 1 i 5 dies de tractament. Tot i que l'eficàcia total no va poder ser demostrada ja que, després d'un èxit inicial, alguns catèters van haver de ser retirats per diferents motius (5 de 13). Per tant, tot i que són resultats prometedors, són insuficients per concloure que la LAmB com a ALT és efectiu (191).

En resum, els estudis *in vitro* i *in vivo* disponibles suggereixen una millor activitat de la LAmB com a ALT respecte a la formulació de dAmB i, reporten que la LAmB pot ajudar significativament a reduir els *biofilms* madurs de *Candida* spp. tot i que en alguns casos no siguin capaços de la seva completa eradicació. Els diferents autors remarquen la importància del substrat, la duració del segellat, l'espècie de *Candida* i l'edat del *biofilm* (198). Tanmateix, els estudis realitzats sobre el tema encara són insuficients.

3.2.1.3. Segellat amb equinocandines

Existeixen diversos estudis a favor de l'ús de les equinocandines com a ALT per a l'eradicació *Candida* spp. creixent en biopel·lícules, ja que demostren una alta eficàcia independentment de l'estadi de maduració d'aquests (144). Les propietats anti-*biofilm* de les equinocandines es va veure ràpidament utilitzant baixes concentracions d'aquestes (72,213).

La majoria dels estudis *in vitro* reportats sobre les equinocandines van ser utilitzant caspofungina i micafungina, i van demostrar tenir una alta eficàcia enfront els *biofilms* de *C. albicans* i *C. glabrata*, i no tanta davant *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* (144,147,214). Tanmateix, es va demostrar que la micafungina presentava una eficàcia significativament major tant en *biofilms* joves com madurs de *C. glabrata*, en canvi, aquesta diferència no era tan evident en els *biofilms* de *C. albicans*. Com s'ha comentat anteriorment, Öncü *et al.* (197) van estudiar l'eficàcia de la dAmB comparada amb caspofungina sobre *biofilms* madurs de *C. albicans* i *C. parapsilosis* i van demostrar una completa esterilització al cinquè dia de tractament. Només hi ha un estudi que compari l'eficàcia de les tres equinocandines (caspofungina, micafungina i anidulafungina) i la LAmB en ALT durant 24 hores de tractament en soques de *C. lusitanae* i *C. guilliermondii* (205). En els seus resultats descriuen una eficàcia del 100% amb caspofungina respecte micafungina, anidulafungina i LAmB. Per contra, Fiori *et al.* (196), van comparar anidulafungina amb caspofungina en soques clíniques de *Candida* spp., formadores de biopel·lícules, i van demostrar que, davant de *C. albicans*, *C. tropicalis*,

C. glabrata i *C. krusei* creixent en *biofilms*, anidulafungina era més eficaç que caspofungina, essent clarament l'equinocandina més eficaç sobre soques de *C. glabrata* (196). Així doncs, pel que fa referència als estudis *in vitro*, s'ha demostrat una clara evidència sobre l'eficàcia de les equinocandines sobre superfícies de silicona i poliestirè i, s'ha vist que aquesta depèn molt de la soca de *Candida* estudiada.

En els models animals reportats sobre el tema, un model d'infecció de catèter en ratolí va estudiar l'eficàcia de caspofungina pel tractament de *C. albicans*, i va observar que el segellat durant 24 hores va eradicar el microorganisme en un 66,7% dels catèters (4/6) (215). En un altre model d'infecció realitzat amb conills en *C. albicans* i, utilitzant un major número de mostres (16 catèters per grup), Shuford *et al.* (206), van demostrar una eradicació del 100% en els animals tractats amb caspofungina després de 7 dies de segellat.

Existeixen únicament dues evidències clíniques amb l'ús de caspofungina pel tractament amb ALT. En un dels casos, caspofungina a 3,33 mg/mL va ser capaç d'eradicar el catèter infectat amb *C. lipolytica* amb 4 dies d'ALT (185). Contràriament, en un pacient amb infecció per *C. parapsilosis* no va respondre al tractament després de 7 dies d'ALT a la mateixa concentració de caspofungina (186).

Per tant, **no hi ha evidències de l'ús d'anidulafungina per ALT ni en models animals ni en casos clínics d'infeccions relacionades amb el catèter produïdes per *Candida* spp.**

Finalment, els resultats obtinguts dels diferents estudis suggereixen que *Candida* spp. possiblement tingui un efecte dependent d'espècie i, per tant, s'hagi d'estudiar la teràpia d'ALT per cada espècie en concret, fet que pot ser crucial per l'èxit d'aquest tipus de teràpia conservadora.

3.2.2. Antibioteràpia ALT de les infeccions relacionades amb els catèters produïdes per ECN d'estafilococs

Les ECN d'estafilococs són els microorganismes causals més freqüents de les infeccions relacionades amb els catèters, essent *S. epidermidis* el més prevalent.

El tractament indicat per l'IDSA, si es retira el catèter, és d'antibioteràpia sistèmica durant 5 a 7 dies i, si aquest es manté, teràpia ALT i antibiòtics sistèmics durant 10-14 dies (13). En cas de que es decideixi conservar el catèter i realitzar ALT, si el tractament fracassa o hi ha recurrència, aquest s'hauria de retirar (171,173,216). El tractament més utilitzat en la conservació del catèter en soques ECN d'estafilococs resistents a la meticil·lina és vancomicina, tant sistèmica com per ALT (173,217,218), tot i així, les recidives produïdes en aquest tractament són del 20%, **motiu pel qual considerem que és necessari explorar noves alternatives terapèutiques**. Avui en dia, alguns dels tractaments proposats per l'ALT utilitzen antibiòtics amb una alta activitat anti-*biofilm*, com la daptomicina i la rifampicina. Tanmateix, aquesta última s'ha demostrat que pot produir interaccions amb els anticoagulants, com l'heparina, motiu pel qual s'ha hagut de limitar el seu ús com a tractament d'ALT (219).

3.2.2.1. Segellat amb vancomicina

Hi ha controvèrsies sobre l'eficàcia de la vancomicina en l'eradicació dels *biofilms* (220,221), i aquests resultats estan basats en la seva penetració limitada a través de la matriu dels *biofilms*. Contràriament a altres fàrmacs, aquesta es difon més lentament a les capes més profundes del *biofilm* i, per tant, els bacteris dins d'aquest mostren una sensibilitat reduïda a causa d'una menor exposició a l'antibiòtic (222). Alguns autors han demostrat que, a causa de l'eficàcia moderada d'aquest fàrmac en front als microorganismes creixent en biopel·lícules, no s'aconsegueix l'eradicació fins a 5 dies després de la seva exposició (223,224).

Hi ha pocs estudis sobre models *in vivo* d'infecció relacionada amb el catèter per ECN d'estafilococs. Aybar *et al.* (225) van demostrar, en un model de CVC en conill que, tot i que tigeiclina i vancomicina van ser eficaços per tractar BRCVC causades per ECN d'estafilococs, l'eficàcia de la tigeiclina va ser significativament major que la de la vancomicina. En un altre model d'infecció en conill, es va demostrar que, tot i que la vancomicina sola mostrava una eficàcia limitada, quan aquesta es co-administrava amb un agent que promovia la permeabilitat del *biofilm* (ambroxol), aquesta es millorava de manera significativa la seva acció (226). Altres estudis sobre el tema estan més centrats en soques de *S. aureus* i, també conclouen que el segellat amb vancomicina no és eficaç per eradicar aquest tipus d'infeccions productores de *biofilms* (227–229). Així doncs, s'ha demostrat que la vancomicina té una eficàcia limitada a causa de la dificultat per penetrar dins les biopel·lícules dels estafilococs, i que és necessari utilitzar-la amb combinació amb altres agents o utilitzar altres teràpies per tal d'aconseguir una bona eradicació d'aquests microorganismes creixent en biopel·lícules.

En clínica, tot i que vancomicina segueix essent el tractament d'elecció per soques resistents a meticil·lina, hi ha un augment dels articles reportant fracassos terapèutics en població adulta, especialment en els casos de soques amb elevades concentracions mínimes inhibidores a vancomicina (230). En comparació amb altres tractaments, la vancomicina presenta una eficàcia temps-depenent, el que fa necessària una alta concentració de manteniment durant extensos períodes de temps per tal de maximitzar l'eficàcia bactericida i la penetració d'aquesta dins del *biofilm* (231).

3.2.2.2. Segellat amb daptomicina

La irrupció de la daptomicina als últims anys ha suposat un replantejament a la recerca d'una nova i millor antibioteràpia per aquestes infeccions de difícil tractament. Existeixen diversos estudis a favor de l'ús de la daptomicina com a ALT per a l'eradicació dels *biofilms* d'estafilococs i altres grampositius, ja que s'ha demostrat una alta eficàcia

bactericida, tant *in vitro* com *in vivo* de manera dosi-depenent, a causa de la seva penetració uniforme i de manera ràpida als *biofilms*, ocasionant la mort cel·lular bacteriana en menys d'una hora després de l'exposició al fàrmac (157,158,232–235). Hi ha diversos estudis comparant l'eficàcia dels diferents antibiòtics utilitzats en infeccions produïdes per estafilococs i en ells s'ha demostrat que la daptomicina actua més ràpidament que la minociclina, la tigeciclina, el linezolid, la vancomicina i la rifampicina en bacteris creixent en *biofilms* (224,236). Cerca *et al.* (237), van demostrar que els antibiòtics que actuen a la paret cel·lular (com alguns dels esmentats anteriorment), independentment de la mida de la molècula, tenen una activitat reduïda als microorganismes que creixen en *biofilms*; a diferència dels antibiòtics en que la seva diana d'acció és l'ARN o la síntesi de proteïnes. Resumidament, tot i que els estudis *in vitro* comparadors entre l'eficàcia de la daptomicina *versus* la vancomicina en el segellat de catèter és limitada, la majoria d'aquests estudis estan a favor de l'ús de la daptomicina, a causa de la seva ràpida activitat anti-*biofilm*. Un model *in vivo* d'infecció en rata, va estudiar l'eficàcia de la daptomicina pel tractament d'ALT en la infecció relacionada al catèter i va demostrar que amb només una dosi d'ALT de 30 minuts ja s'obtenia eradicació en els catèters, cosa que demostrava una ràpida penetració d'aquesta a través del *biofilm* (232).

Segons el nostre coneixement, només hi ha tres evidències clíniques que descriuen l'activitat de la daptomicina com a ALT associada amb tractament sistèmic causades per ECN d'estafilococs. Del Pozo *et al.* (182) i Tatarelli *et al.* (238) van descriure una eficàcia de curació del 82 i 75%, respectivament, als 13 -14 dies de tractament ALT amb daptomicina a 5 mg/mL. Més recentment, Vassallo *et al.* (219) van demostrar eficàcia en un 76% dels pacients utilitzant segellat amb daptomicina 5 mg/mL durant períodes curts de tractament (segellats de 18 hores) amb ALT durant 3 dies.

Així doncs, la daptomicina sembla ser un antibiòtic prometedor per l'ús d'ALT, a causa del seu potent efecte en soques d'ECN d'estafilococs resistents a la

meticil·lina involucrats en la formació de *biofilm* (20,222). S'ha hipotetitzat que la taxa de recurrències en els casos en que s'utilitzi daptomicina serien inferiors en comparació amb els tractaments actualment utilitzats, ja que s'ha demostrat que té la propietat de disgregar el *biofilm* en totes les seves fases de formació (239). Tanmateix, l'estratègia conservadora utilitzant daptomicina per ALT podria tenir beneficis potencials pel que refereix a un ràpid accés del catèter o per reduir l'estància hospitalària i, per tant, millorant la qualitat de vida del pacient.

3.2.3. Segellat amb etanol

En els últims anys s'ha proposat el segellat del catèter amb etanol com a teràpia alternativa davant diferents microorganismes (240–247). Tot i que alguns autors han estudiat la seva eficàcia i s'han obtingut resultats prometedors, despertant un entusiasme especial per seguir estudiant en aquest camí, la utilització d'etanol com a ALT s'ha relacionat amb diversos efectes adversos associats. D'entre els quals es destaquen: (i) canvis en la integritat del catèter, com per exemple divisions o fissures del mateix, sobre tot si aquest és de poliuretà, i en menor mesura de silicona (248–250); (ii) incidència d'efectes secundaris sistèmics, com alteracions al fetge (elevació de les transaminases), increment del risc d'hemòlisi dels eritròcits ja que, d'una manera dosi-dependent, l'etanol modifica la forma i la fluïdesa d'aquests (251,252); (iii) estimulació de la formació de *S. aureus* o *S. epidermidis* productors de *biofilms*, així com l'increment de l'expressió de factors de resistència (253,254); (iv) interacció amb altres medicacions administrades a través del catèter posteriors a l'ALT amb etanol (255); (v) recurrència en el 12% dels casos (243) i, finalment; (vi) obstrucció del catèter a causa del contacte amb el plasma, ja que no presenta propietats anticoagulants (256).

4. Models d'infecció experimental

Actualment hi ha diferents models experimentals pels estudis de sensibilitat antimicrobiana pels microorganismes creixent en *biofilms*. Tot i les limitacions que

puguin presentar, aquests han servit per a conèixer millor les particularitats d'aquestes infeccions, així com l'aproximació terapèutica a utilitzar. S'ha de distingir entre els models d'experimentació *in vitro*, els que es duen a terme en un ambient controlat (per exemple al laboratori), i els models *in vivo*, els que es realitzen directament sobre un ésser viu. El que es pretén en els models *in vitro* és que aquests siguin imitats el millor possible en el model *in vivo* i, per tant, els resultats obtinguts puguin ser clínicament rellevants.

4.1. Models d'estudi *in vitro*

Els models *in vitro* permeten un enorme nivell de simplificació del sistema d'estudi, perquè es poden estudiar diferents paràmetres de manera individualitzada. Això també li genera la desavantatge de que els resultats no sempre són extrapolables ni solen predir l'èxit terapèutic del que succeirà en un ésser viu, ja que aquests models no tenen en compte factors ambientals, factors de l'hoste, sistema immunitari, etc. Tot i això, aquests models ens permeten una primera aproximació essent, generalment, de baix cost, fàcils de manejar i reproduïbles (257).

Actualment, un dels problemes addicionals a la pràctica clínica relacionada amb la resistència dels microorganismes creixent en biopel·lícules enfront als antimicrobians, és la falta de correlació entre els resultats de sensibilitat determinats mitjançant les guies i els resultats clínics dels pacients que pateixen aquest tipus d'infeccions (258). Els estàndards per a la determinació de la sensibilitat als antimicrobians (el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) a Estats Units (259) i l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) a Europa) (260) estan basats en microorganismes creixent en forma planctònica i, això, no prediu la eficàcia davant els homòlegs creixent en biopel·lícules. La majoria dels models que impliquen un creixement formant biopel·lícules són laboriosos, requereixen d'una manipulació experta i l'ús d'equips especialitzats que, generalment no estan disponibles als laboratoris de microbiologia clínica. Per tant, es requereix de manera urgent la

necessitat d'introduir nous mètodes estandarditzats, senzills i dissenyats per a mesurar la sensibilitat antimicrobiana dels microorganismes creixent en *biofilms* d'una manera sistemàtica.

Dels models existents per l'estudi d'aquests microorganismes creixent en *biofilms*, cada un d'ells s'enfoca en el seu camp d'aplicació. Aquests estudien el creixement sobre diferents substrats, ja sigui plaques de microtitulació de poliestirè, cupons de silicona, làmines de vidre, substrats de titani, discos acrílics, etc. Un dels problemes per avaluar l'activitat antimicrobiana dels microorganismes creixent en biopel·lícules sobre els catèters, és la falta de models *in vitro* que siguin equivalents, el que explica la variabilitat dels resultats als diversos treballs publicats.

Tanmateix, aquests models també inclouen *biofilms* formats en condicions estàtiques o dinàmiques (59,92,261). S'ha demostrat que en els estudis realitzats *in vitro*, la matriu extracel·lular produïda és incrementada dràsticament quan els microorganismes creixen formant el *biofilm* de manera dinàmica i no estàtica (67). Convé destacar que dins del sistema circulatori d'un ésser viu les condicions de flux són elevades (condicions dinàmiques), fet que afavoreix el creixement d'aquests microorganismes desenvolupant grans quantitats de MEC. Tot i aquest fet, s'ha demostrat que, en ambdues situacions, la resistència als antimicrobians és la mateixa, sense ser rellevant la quantitat de MEC produïda (66). Així doncs, ja que els estudis en estàtic impliquen tècniques més senzilles i menys costoses, aquest és el motiu pel qual han sigut utilitzats durant anys per a l'estudi de la sensibilitat antibiòtica dels microorganismes creixent en *biofilms*. Alguns d'aquests mètodes de determinació en creixement estàtic són:

4.1.1. Determinació de d'activitat metabòlica dels microorganismes creixent en biopel·lícules

Un model àmpliament utilitzat per estudiar la sensibilitat antimicrobiana dels microorganismes creixent en biopel·lícules després de l'exposició de l'antimicrobià

consisteix en mesurar la reducció de la sal de tetrazol: *2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphonyl)- 5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide* (XTT) (53). És un mètode colorimètric que mesura l'activitat mitocondrial de les cèl·lules, mitjançant un compost capaç de reduir-se i adquirir un color vermellós quan es transforma de sal de tetrazol a formazan per acció dels enzims intramitocondrials de les cèl·lules vives (50). És la mateixa reducció que la ocasionada com a conseqüència de l'activitat enzimàtica de les cèl·lules viables dels microorganismes dins dels *biofilms* (67,92). És una tècnica no invasiva i no destructiva, que requereix un post-processat mínim de les mostres, comparat amb altres tècniques (53). Pel que fa referència als llevats, aquesta sal es redueix per deshidrogenases mitocondrials, mentre que, en bacteris, l'XTT és reduït per enzims de la cadena respiratòria que estan localitzades a la membrana plasmàtica (262–264).

Així doncs, aquest mètode, que es quantifica mitjançant mesures espectrofotomètriques del color indica, de forma directa, el número de cèl·lules vives presents en els cultius.

4.1.2. Tècniques mitjançant cultius quantitativus

Les tècniques dels cultius quantitativus són una eina bàsica a qualsevol laboratori de microbiologia per a poder detectar i, posteriorment identificar o quantificar, els microorganismes presents a través de sembra i incubació en medis de cultiu artificials. S'ha de destacar que el cultiu microbià requereix més temps que altres proves, ja que és necessari permetre una reproducció suficient del microorganisme per a què aquest mostri evidències del seu creixement.

Com a tècnica “*gold*” estàndard per a l'avaluació de la sensibilitat antimicrobiana en microorganismes creixent en planctònic és la dilució en caldo, ja que aporta informació quantitativa de l'antimicrobià que, després de la incubació d'aquest amb el microorganisme, s'estableix com la mínima concentració on no s'observa creixement d'aquest: anomenat concentració mínima inhibidora (CMI). Aquesta tècnica també s'utilitza per avaluar per la sensibilitat dels antimicrobians enfront microorganismes

creixent en biopel·lícules mitjançant la determinació de la concentració mínima inhibidora o eradicadora del *biofilm* (CMIB i CMEB, respectivament)(265).

4.1.3. Tècniques de viabilitat en microscòpia

Les tècniques d'imatge s'han convertit en una eina indispensable per a la investigació de l'estructura tridimensional de la biopel·lícula. Durant anys, les lents d'augment i la microscòpia òptica tradicional van ser els principals mètodes d'observació. Tot i això, amb les noves tècniques de microscòpia confocal i electrònica s'ha permès un coneixement molt més exhaustiu de les propietats i del comportament dels microorganismes que creixen formant biopel·lícules, la seva heterogeneïtat espacial, així com la penetració i l'eficàcia dels diferents antimicrobians (266).

El microscopi làser confocal de rastreig (CLSM de l'anglès *confocal laser scanning microscopy*) és àmpliament utilitzat, ja que l'equip permet realitzar talls òptics virtuals al llarg de la imatge d'una manera no destructiva i possibilita visualitzar els microorganismes vius. Per a visualitzar la sensibilitat dels microorganismes de la biopel·lícula enfront a un antimicrobià en el microscopi, una de les tincions més utilitzades és el Kit Live/Dead® (267), que serveix tant per bacteris com per cèl·lules eucariotes. Aquest conté dos marcadors d'àcids nucleics, el SYTO9 i el Iodur de Propidi (PI de l'anglès *propidium iodide*). El fluorocrom SYTO9 és una petita molècula que pot penetrar a l'interior de les cèl·lules que posseeixen intacta la seva membrana plasmàtica, proporcionant una fluorescència verda. En canvi, el fluorocrom PI és impermeable a la membrana i per tant només penetra si aquesta està malmesa. Per tant, si la cèl·lula no és viable, els dos colorants penetraran a l'interior de la cèl·lula proporcionant una fluorescència de color vermell, degut a la reducció del SYTO9 per part del PI.

4.2. Models *in vivo* d'infecció relacionada amb el catèter en conill

Tot i que els experiments *in vitro* ofereixin resultats que apuntin a la possible eficàcia d'un determinat tractament antimicrobià, no ens hem d'oblidar que, a la pràctica clínica, els dispositius intravasculars estan en contacte directe amb la circulació sanguínia. Com a conseqüència, la seva superfície acaba revestint-se de plaquetes, plasma i proteïnes tissulars, que actuen com a condicionadors de la superfície afavorint l'adherència dels microorganismes i la formació de *biofilm* (216). Tanmateix, en una infecció relacionada amb el dispositiu hi ha interaccions dinàmiques entre l'hoste i els microorganismes creixent en biopel·lícules que, com s'ha comentat, són ecosistemes microbians complexes. Tot això genera una complicació que fa imprescindible utilitzar models adequats que tinguin en compte tots aquests tipus d'interaccions (257,268).

En un brot epidemiològic de diferents casos de BRCVCs, es va poder observar que les infeccions en aquest entorn estan associades amb el creixement dels microorganismes creixent formant biopel·lícules. Els primers models *in vivo* es basaven en la implantació subcutània de segments de catèters i, tot i que servissin com a models d'ajuda per a comprendre els mecanismes implicats en aquesta forma de creixement dels microorganismes, eren models no discriminatius que no tenien les principals característiques d'aquest tipus d'infeccions, com són la interacció amb els components o el flux sanguini. Aquestes limitacions van donar peu al desenvolupament de nous models més selectius que integraven aquests aspectes.

El primer model de catèter venós intravascular es va descriure l'any 1999, per estudiar la colonització bacteriana i subseqüent infecció de *S. epidermidis* i es va realitzar inserint, mitjançant cirurgia, un catèter de Silàstic® a través de la vena cava superior de rates adultes (269). A partir d'aquí, aquest model ha estat utilitzat àmpliament en molts estudis relacionats en aquest tema (270,271). Tanmateix, han sigut utilitzades altres espècies d'animals, com ratolins o conills, i també s'ha realitzat estudiant diferents microorganismes, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Candida* spp., etc (229,232,272). Fins a dia

d'avui, el model animal més utilitzat per estudiar el tractament conservador de les infeccions relacionades amb el catèter mitjançant la tècnica del segellat antimicrobià és el del conill (273), ja que la seva mida permet una còmoda inserció del catèter i, d'altra banda, el diàmetre del catèter utilitzat és similar el que s'utilitza en humans, el que garanteix la reproductibilitat dels resultats. Les dades obtingudes en els diferents models animals realitzats en infeccions de catèter i tractament mitjançant ALT s'han utilitzat per a dissenyar estudis clínics i, alguns d'aquests compostos són utilitzats actualment en clínica (182,274).

4.2.1. Experiència prèvia del model en el laboratori de Resistència als Antibiòtics del Servei de Malalties Infeccioses del VHIR

Seguint la línia d'investigació del laboratori, iniciada pel Dr. Gavaldà, en la present Tesi Doctoral s'ha utilitzat el model d'infecció relacionada amb el catèter en el model de conill. En els anys previs al present projecte, el grup va realitzar diferents treballs exitosos sobre el tractament conservador de les infeccions relacionades amb catèters causades per ECN d'estafilococs i *S. aureus*, confirmant que la vancomicina, tot i ser l'antibiòtic de referència per aquest tipus d'infeccions, té una eficàcia moderada, similar a la del linezolid, davant de *S. epidermidis* i *S. aureus* (tant sensible com resistent a meticil·lina), i que la ciprofloxacina presenta una eficàcia lleugerament superior a vancomicina en soques de *S. aureus* sensibles a la meticil·lina. Finalment, dosis altes de gentamicina i daptomicina són ràpidament bactericides i poden negativitzar en 24 hores un alt percentatge de catèters colonitzats per *S. aureus* (228,229,275).

En el present projecte de Tesi Doctoral, s'ha traslladat l'experiència acumulada pel Servei de Malalties Infeccioses en la seva vessant clínica del tractament conservador d'aquestes infeccions i de la recerca dels anys del laboratori de Malalties Infeccioses en el model d'infecció relacionada amb el catèter. Amb tot plegat, hem buscat en els estudis *in vitro* i els models experimentals, solucions

per a trobar la millor opció terapèutica a escollir en els casos molt seleccionats d'infeccions produïdes per diferents espècies de *Candida*. Tanmateix, utilitzant les mateixes eines de treball, hem intentat ampliar els coneixements sobre altres possibles tractaments que es podrien plantejar per a la utilització de la estratègia del segellat del catèter en el cas d'infeccions produïdes per ECN d'estafilococs.

**III. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I
HIPÒTESIS DE TREBALL**

III. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I HIPÒTESIS DE TREBALL

Com s'ha desenvolupat a l'apartat anterior, les infeccions relacionades amb els LTCVCs, presenten un problema clínic de difícil solució; tant per la capacitat dels microorganismes de créixer formant biopel·lícules dins de la llum del catèter, com per la manca d'antimicrobians ràpids i eficaços en aquesta situació clínica.

En el cas de les infeccions produïdes per *Candida* spp., les guies actuals recomanen la retirada i reinserció d'un nou LTCVC (13,37). Però, hi ha situacions en que s'hauria de poder considerar la possibilitat d'una teràpia conservadora del catèter. Aquestes situacions es tractarien de casos clínicament no complicats de pacients en que la retirada del catèter és difícil, com la trombopènia greu amb risc de sagnat, quan existeixen dificultats per trobar un accés vascular alternatiu, per exemple en pacients pediàtrics, certs pacients amb fallada intestinal i necessitat de nutrició parenteral permanent o en pacients oncològics amb neoplàsies de mal pronòstic, en els que cal valorar el risc/benefici d'un tractament conservador.

La revisió de la literatura, a l'inici de la Tesi Doctoral, va evidenciar que no existia una resposta definitiva, ni des dels estudis *in vitro* ni en els models animals, essent la informació reportada procedent de pacients molt escassa i, sovint, contradictòria. Per aquests motius vàrem plantejar que podíem intentar aportar respostes a la pregunta inicial, des dels models de sensibilitat de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules fins a l'evaluació de l'eficàcia de diferents antifúngics mitjançant ALT en el model experimental d'infecció de catèter en conill.

Així doncs, es va començar a treballar amb *C. parapsilosis*, la segona etiologia més prevalent a molts països europeus, a diferència d'Estats Units (276). De les diferents opcions de tractaments antimicrobians, vam iniciar estudis amb aquells ja comercialitzats, de manera que els resultats poguessin ser fàcilment extrapolats a la pràctica clínica. Dels tractaments clàssics utilitzats en aquests tipus de infeccions per

Candida spp., s'ha demostrat que els azols són intrínsecament resistents i que la dAmB té una baixa activitat enfront els microorganismes creixent en biopel·lícules. Contràriament, s'ha vist que les formulacions liposomals de AmB i les equinocandines, presenten una major eficàcia d'eradicació, ja que poden penetrar millor a l'interior de les biopel·lícules. Així doncs, es va hipotetitzar que ambdós podrien ser possibles antifúngics per l'ús d'ALT en les infeccions de catèter produïdes per *C. parapsilosis*.

A partir dels resultats prometedors obtinguts en el primer treball, es va assolir que eren necessaris més estudis en els models de sensibilitat en biopel·lícules i experimental per a poder aportar el millor tractament antifúngic davant de les altres espècies més prevalents de *Candida*: *C. albicans* i *C. glabrata*, fet que pot ser crucial per l'èxit d'aquest tipus de teràpia conservadora.

En el cas de les infeccions produïdes per l'agent causal més freqüent de les infeccions de catèter, ECN d'estafilococs, les guies actuals (13,37) recomanen una actitud més conservadora, intentant salvar el catèter mitjançant ALT i antibioteràpia sistèmica prolongada. El tractament més utilitzat en aquests casos és la vancomicina, tot i així, les recidives produïdes per aquest tractament són del 20%, motiu pel qual es va considerar que era necessari estudiar i avaluar noves alternatives terapèutiques. Diferents estudis han mostrat que la vancomicina, a causa de ser un antibiòtic amb un efecte del tipus temps-depenent, té una eficàcia limitada a causa de la dificultat de penetrar dins dels microorganismes creixent en biopel·lícules. Contràriament, amb la daptomicina, que és un fàrmac amb efecte del tipus concentració-depenent, s'ha demostrat que té una alta eficàcia bactericida a causa de la seva penetració uniforme i de manera ràpida en els microorganismes de l'interior de les biopel·lícules. Així doncs, la daptomicina a concentracions altes semblava ser un antibiòtic prometedor per l'ús d'ALT.

Per tant, en aquesta Tesi Doctoral, es va plantejar incorporar noves troballes sobre les opcions terapèutiques més ràpides i eficaces per a poder utilitzar com a tractament per

ALT. Això permetria una estratègia conservadora dels LTCVCs en casos seleccionats de pacients infectats amb *Candida* spp., o en els pacients amb infeccions per ECN d'estafilococs, proporcionant beneficis potencials com ara, millorar la vida útil del catèter així com el pronòstic del pacient, prevenir les seqüeles relacionades amb aquest tipus d'infeccions, reduir l'estància hospitalària i, en definitiva, millorar de la qualitat de vida del pacient i reduir el cost sanitari associat.

D'altra banda, tot i que els experiments *in vitro* ofereixen resultats que apunten a la possible eficàcia d'un tractament, és molt difícil extrapolar la resposta terapèutica realitzada en un model *in vitro* amb el que succeirà finalment a la pràctica clínica, ja que només es poden descriure els efectes d'una variable en un subconjunt de les parts constitutives d'un organisme. Tanmateix, el cos humà és molt més que la suma de les seves parts i, per tant, no l'hem de veure com a factors independents, sinó com a peces que interaccionen (277). Els models animals són una eina clau ja que permeten mimetitzar la complexitat d'un organisme i reproduir les condicions, d'una forma dinàmica, del que passa a un ésser humà. El nostre grup de recerca té una àmplia trajectòria en el camp de la infecció experimental relacionada amb els CVCs, desenvolupada al Laboratori de Resistència al Antibiotics del Servei de Malalties Infeccioses del VHIR, havent-se demostrat ja possibles tractaments antimicrobians per aquest tipus d'infeccions causades per diferents microorganismes. Per tota aquesta experiència prèvia es va considerar que, en el present projecte de Tesi Doctoral, el model animal seria un mètode adequat per analitzar les possibilitats terapèutiques de major eficàcia en l'àmbit de les infeccions relacionades amb els LTCVC per diferents espècies de *Candida* i per ECN d'estafilococs.

Les publicacions resultants dels experiments realitzats sobre les infeccions relacionades amb el catèter seran la base que constituïran la present Tesi Doctoral:

- **“Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique”** analitza quin es el material més adequat per realitzar els experiments de sensibilitat *in vitro* de les infeccions relacionades al catèter. D'altra banda, avalua l'eficàcia de l'amfotericina B liposomal i l'anidulafungina, tant *in vitro* com en un model d'infecció relacionada amb el catèter en conill, enfront soques de *C. parapsilosis* creixent en biopel·lícules, essent el primer estudi que descriu l'ús d'anidulafungina pel segellat de catèter en aquesta espècie de *Candida*.
- **“High-dose daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a rabbit model of *Staphylococcus epidermidis* catheter-related infection”** estudia l'activitat de la daptomicina i la vancomicina enfront soques de *S. epidermidis* productores de biopel·lícules, tant *in vitro* com en un model animal d'infecció de catèter utilitzant la tècnica conservadora del segellat. El principal problema de les infeccions relacionades a LTCVCs per ECN d'estafilococs és causat pel seu percentatge de recurrència, així doncs, en aquest treball es pretén obtenir un tractament capaç d'eradicar la infecció del catèter de manera més ràpida i eficaç, per tal d'evitar o reduir aquestes recaigudes.

Com a Annex, s'ha adjuntat un altre article (pendent de publicació i, a l'actualitat, en fase de revisió), **“Efficacy of liposomal amphotericin B and anidulafungin using an antifungal lock technique (ALT) for catheter-related *Candida albicans* and *Candida glabrata* infections”** que es centra en la infecció de catèter causada per espècies de *C. albicans* i *C. glabrata* productores de biopel·lícules. El seu objectiu és avaluar l'eficàcia de l'amfotericina B liposomal i l'anidulafungina, tant *in vitro* com en un model

d'infecció relacionada amb el catèter en conill. Tanmateix, és el primer estudi que descriu l'ús d'anidulafungina pel segellat de catèter en *C. albicans* i *C. glabrata*.

Tot i que el treball de l'annex encara està pendent de publicació, es considera molt interessant adjuntar-lo i mencionar-lo en aquesta Tesi Doctoral, ja que segueix una estructura similar als treballs publicats i els resultats obtinguts ajudarien a entendre millor els possibles tractaments que es podrien utilitzar per les infeccions relacionades amb els LTCVC produïdes per les diferents espècies de *Candida*.

Per a facilitar una major comprensió de la Tesi Doctoral, l'ordre en que es mencionen els treballs serà: primer els estudis de *Candida* spp. (treball 1: article publicat de *C. parapsilosis* i treball 2: article pendent de publicació i adjuntat a l'annex de *C. albicans* i *C. glabrata*) i, seguidament, parlarem de l'estudi de *S. epidermidis* (treball 3: article publicat de *S. epidermidis*).

En concret, les hipòtesis plantejades són les següents:

1. Els estudis de sensibilitat *in vitro* dels microorganismes creixent en biopel·lícules, fent servir el mateix substrat utilitzat a la pràctica clínica pot reflectir amb major precisió l'acció real dels antimicrobians que les tècniques convencionals.
2. Les concentracions molt elevades dels antimicrobians poden ser eficaces per a l'eradicació dels microorganismes que formen biopel·lícules en materials sintètics, com serien els catèters vasculars.
3. La tècnica del segellat amb diferents antimicrobians pot ser ràpida i eficaç en el model animal d'infecció de catèter produïda per *Candida* spp.
4. La eficàcia dels antimicrobians pot estar relacionada amb l'espècie de *Candida* que ocasiona la infecció relacionada amb el catèter.
5. La daptomicina, utilitzada pel segellat antimicrobià del catèter, és més eficaç que la vancomicina en el model experimental d'infecció de catèter per *S. epidermidis*.

IV. OBJECTIUS

IV. OBJECTIUS

Objectiu principal

Avaluar l'eficàcia de diferents antimicrobians utilitzant la tècnica del segellat de catèter, enfront *Candida* spp. i *S. epidermidis* creixent en biopel·lícules, tant *in vitro* com en un model experimental d'infecció de catèter en conills.

Objectius secundaris

1. Avaluar l'activitat *in vitro* de l'amfotericina B liposomal i l'anidulafungina enfront soques de *Candida parapsilosis* que creixen formant biopel·lícules sobre diferents substrats.
2. Avaluar l'eficàcia terapèutica de la daptomicina i la vancomicina enfront *Staphylococcus epidermidis* que creixen formant biopel·lícules, tant *in vitro* com en un model experimental d'infecció de catèter en conill utilitzant la tècnica del segellat de catèter.
3. Avaluar l'eficàcia terapèutica de l'amfotericina B liposomal i l'anidulafungina enfront diferents espècies de *Candida* que creixen formant biopel·lícules, tant *in vitro* com en un model experimental d'infecció de catèter en conill utilitzant la tècnica del segellat de catèter.

V. MATERIALS I MÈTODES

V. MATERIALS I MÈTODES

1. Selecció de soques

Es van utilitzar 6 aïllaments clínics de *Candida* spp. (dues soques de *C. parapsilosis*, dues de *C. albicans* i dues de *C. glabrata*) i 2 de *S. epidermidis* que provenien d'una col·lecció de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de pacients amb bacterièmia i candidèmia relacionades amb catèters vasculars. Les soques van ser seleccionades per la seva capacitat formadora de biopel·lícules, seguint el model descrit per Kamagata-Kiyoura *et al.* (278).

2. Estudis *in vitro*

2.1. Esquema del disseny experimental: *in vitro*

A continuació es mostra l'esquema del disseny experimental *in vitro* que s'ha realitzat a cada article (Figura 5). Tots els experiments es van realitzar per triplicat.

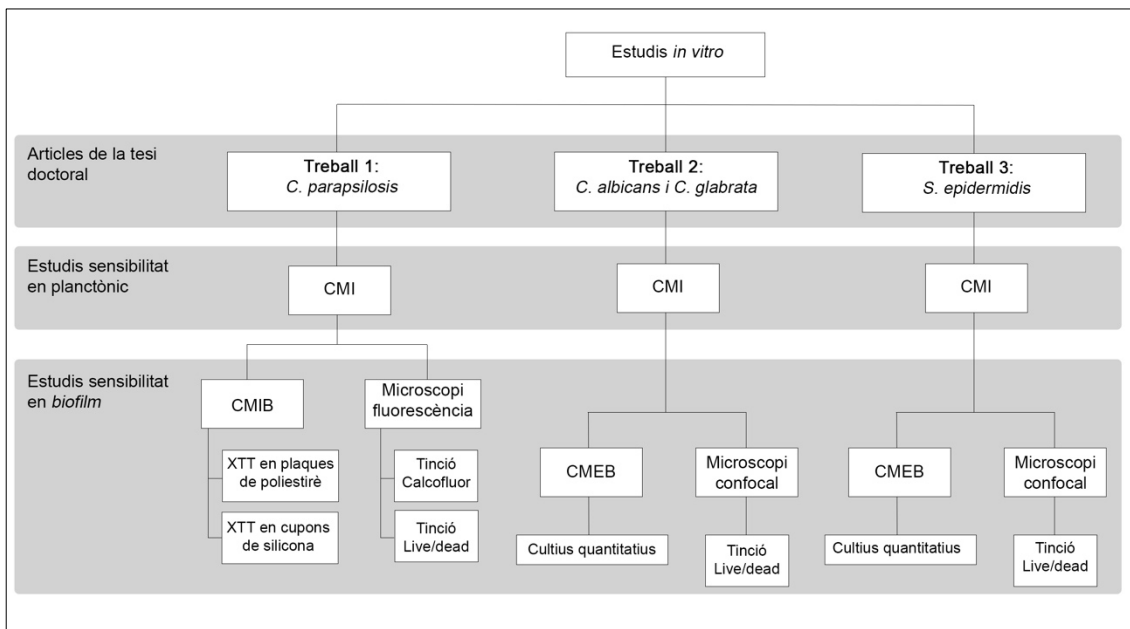


Figura 5. Esquema del disseny experimental dels diferents estudis que componen la tesi doctoral. CMI, concentració mínima inhibidora; CMIB, concentració mínima inhibidora de *biofilm*; CMEB, concentració mínima eradicadora de *biofilm*, XTT; 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphonyl)- 5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide.

2.2. Estudis de sensibilitat

Les CMI's de cada antimicrobià es van determinar per microdilució seguint les recomanacions de les guies de l'EUCAST (260). La CMIB₅₀ i la CMIB₉₀ de la LAmB i l'anidulafungina enfront de *C. parapsilosis* creixent en biopel·lícules sobre diferents substrats (plaques de poliestirè i discos de silicona, Figura 6) es van realitzar mitjançant l'anàlisi de reducció de la sal de tetrazol (XTT; Sigma-Aldrich Co., Madrid, Espanya). Es van utilitzar dos procediments experimentals: (i) estudi de l'XTT en plaques de poliestirè utilitzant el protocol descrit per Pierce *et al.* (279) i (ii) estudi de l'XTT en discos de silicona utilitzant el protocol descrit per Chandra *et al.* (280). Els canvis colorimètrics obtinguts al final del procediment, es van mesurar mitjançant lectures espectrofotomètriques amb el sistema Elx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, Estats Units d'Amèrica). En ambdós procediments, la menor concentració antifúngica que va causar el 50 i 90% de la reducció de l'activitat metabòlica del *biofilm*, comparada amb el control negatiu, es va considerar com CMIB₅₀ i CMIB₉₀, respectivament.

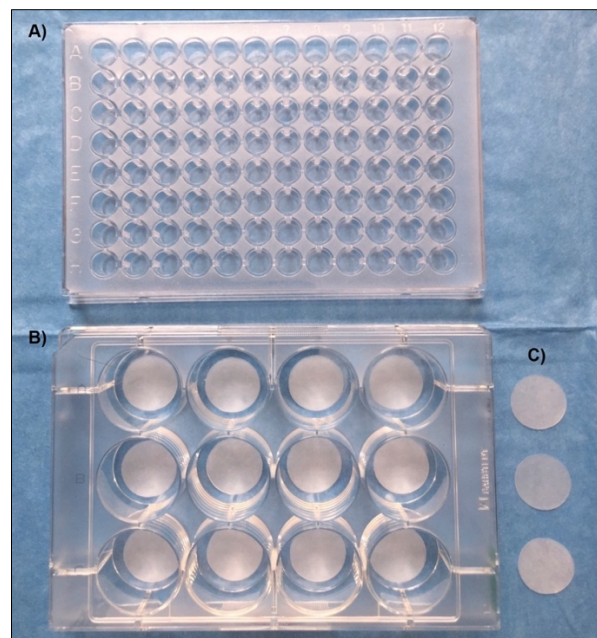


Figura 6. A) plaques de microtitulació de poliestirè B) plaques de fondo pla amb cupons de silicona a l'interior, C) cupons de silicona.

A partir dels resultats obtinguts al primer treball (descriu a l'apartat de resultats del treball 1), **tots els estudis *in vitro* posteriors de sensibilitat dels antimicrobians es van realitzar únicament fent créixer els microorganismes productors de *biofilms* sobre substrats de silicona.**

Per a determinar la CMEB₉₀, es van rascar els *biofilms* formats i tractats dels cupons de silicona mitjançant un cell scraper (Sarstedt, Inc., Newton, NC, Estats Units) i, finalment, es va realitzar el recompte de les UFC/mL mitjançant cultius quantitius. La CMEB₉₀ es va definir com la concentració mínima eradicadora que necessita l'antimicrobià per a reduir més del 90% dels microorganismes (respecte l'inòcul inicial).

2.3. Morfologia i viabilitat cel·lular

Per a determinar la morfologia i l'arquitectura cel·lular, es va utilitzar la tinció de Calcofluor® white M2R (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Espanya) durant 1 minut a la foscor i, per a la viabilitat cel·lular es va utilitzar el Kit de viabilitat Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, Països Baixos) tenyint les mostres durant 15 minuts a temperatura ambient i a la foscor.

Les soques *C. parapsilosis* del primer article, van ser visualitzades mitjançant el microscopi de fluorescència (microscopi de la marca Olympus i model DP72 connectat a una càmera Nikon E600) i les soques dels estudis posteriors (*C. albicans*, *C. glabrata* i *S. epidermidis*) van ser visualitzades mitjançant el CLSM invertit de la marca Olympus i model FV1000. Es van escanejar tres àrees del *biofilm* de cada cupó a 2 µm/tall i es van adquirir diferents imatges en els plans XY. Simultàniament es va utilitzar el doble canal per a observar la fluorescència verda i la vermella. El software IMARIS 8 (Bitplane, Belfast, Regne Unit) es va utilitzar per a crear una projecció dels *biofilms*, i el software ImageJ 1.45s per a calcular el percentatge dels píxels verds (cèl·lules vives) *versus* els vermells (cèl·lules mortes).

3. Estudis *in vivo*

3.1. Comitè Ètic d'Experimentació Animal

Tots els experiments van ser aprovats pel CEEA del VHIR i pel DAAM de la Generalitat de Catalunya (números de registre dels treballs 1 i 2: CEEA 73/12 i DAAM 7863. Número de registre del treball 3: CEEA 56/10).

3.2. Esquema del disseny experimental: *in vivo*

A continuació es mostra, de manera esquemàtica, el disseny experimental utilitzat en els diferents articles sobre el model animal d'infecció de catèter en conill. L'esquema dels treballs 1 (*C. parapsilosis*) i 2 (*C. albicans* i *C. glabrata*) es representa a la Figura 7A i l'esquema del treball 3 (*S. epidermidis*) a la Figura 7B.

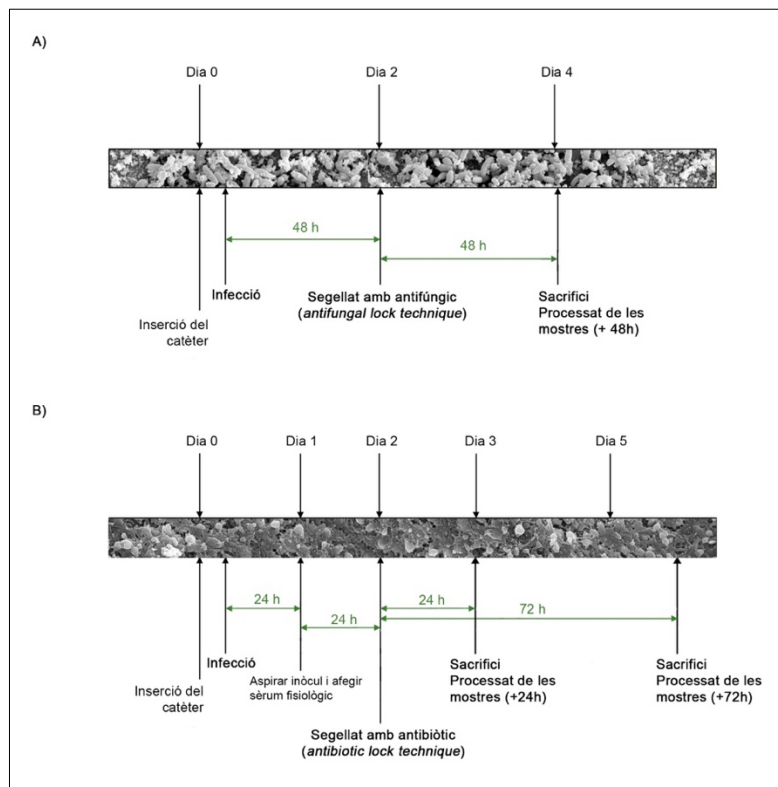


Figura 7. Esquema del disseny experimental del model d'infecció de catèter vascular. A) Infecció per *Candida* spp. B) Infecció per *S. epidermidis*.

A continuació s'expliquen amb més detall cada un dels procediments:

3.3. Model d'infecció de catèter

Es van utilitzar conills mascles blancs *New Zealand* de 2,0-2,2 Kg de pes (Granja Riera, Barcelona, Espanya) i aquests van tenir accés d'aigua i menjar *ad libitum* durant tot l'experiment. Prèviament a la cirurgia, els animals es van anestesiari amb una injecció intramuscular d'una barreja de 100 mg/Kg de Ketolar[®] amb 20 mg/Kg de Xilagesic[®] al 2%. Es va realitzar una incisió laterocervical i es va localitzar la bifurcació de la vena jugular. Aquesta es va cateteritzar amb un catèter de silicona estèril de 18 cm (Silastic[®], ID/OD: 0.45/0.77 inch, Dow Corning Corporation, MI, Estats Units) (Figura 8). Finalment, el catèter es va tunelitzar subcutàniament cap a la regió interescapular i la porció externa del catèter es va unir a una connexió extraïble (Vygon 1298.20; Laboratoris Vygon, Ecoulen, França) unida a un tap perforable (Sendal TP Inter Minisend, Regne Unit).

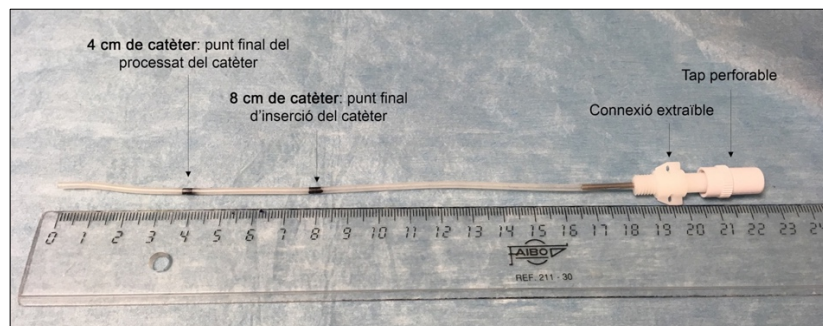


Figura 8. Catèter de silicona de 18 cm de llargada utilitzat pel model animal d'infecció de catèter.

Un cop els animals es van despertar de la cirurgia, cada un dels inòculs es va introduir a la llum del catèter vascular amb un volum de 0,34 mL. Els inòculs de *Candida* spp. es van deixar al lumen d'aquest durant 48 hores i en el cas de les soques de *S. epidermidis*, va ser necessari inocular el lumen del catèter durant 24 hores i, posteriorment, aspirar-lo i introduir sèrum salí al 0,9% durant 24 hores més.

3.3.1. Grups de tractament

Prèviament a la teràpia antimicrobiana, es va aspirar l'inòcul dels catèters. Posteriorment, aquests es van omplir (*antimicrobial lock*) amb 0,4 mL de la solució antimicrobiana. Els animals dels diferents grups van ser seleccionats aleatòriament i es van classificar en els següents grups de tractament: pels estudis de *Candida* spp. (i) control (sèrum salí al 0,9%); (ii) amfotericina B liposomal 5 mg/mL i (iii) anidulafungina 3,33 mg/mL. El tractament d'*antifungal lock* es va deixar a l'interior del catèter durant 48 hores. Per a l'estudi de *S. epidermidis* (i) control (sèrum salí al 0,9%); (ii) vancomicina 10 mg/mL; (iii) daptomicina 5 mg/mL i (iv) daptomicina 50 mg/ml. El tractament d'*antibacterial lock* es va deixar a l'interior del catèter durant 24 i 72 hores.

Al final de la teràpia antimicrobiana, els animals es van sacrificar mitjançant una sobredosi anestèsica de pentobarbital. Posteriorment, es van extreure els catèters d'una forma asèptica i els 4 centímetres distals es van avaluar microbiològicament. D'una banda, es va avaluar el percentatge de negativització dels catèters i d'altra banda es van quantificar les UFC dels catèters en que hi havia creixement. Els resultats d'aquests cultius quantitius es van expressar com a \log_{10} de UFC totals recuperades del catèter.

3.3.2. Anàlisi estadístic

Per a l'anàlisi estadístic del model animal, el percentatge de negativització dels catèters que es va obtenir a cada tractament, es va comparar utilitzant el test exacte de Fisher i la quantificació dels cultius quantitius, obtinguda a través del \log_{10} de UFC recuperades dels catèters, es van comparar utilitzant la prova no paramètrica U de Mann-Whitney (treball 1) i mitjançant l'anàlisi la variància ANOVA d'un factor o comparacions múltiples utilitzant el test *post hoc* de Tukey's (treballs 2 i 3). Les diferències es van considerar significatives quan el valor de $p \leq 0,05$ en el test estadístic corresponent utilitzant el programa SPSS, versió 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estats Units).

VI. RESULTATS

VI. RESULTATS

TREBALL 1: Eficàcia de l'anidulafungina en el tractament de la infecció de catèter experimental per *Candida parapsilosis* utilitzant la tècnica de l'*antifungal lock*

Títol original: "Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an *antifungal-lock technique*"

Autors: Jana Basas¹, Alba Morer¹, Carlos Ratia¹, María Teresa Martín², José Luis del Pozo³, Xavier Gomis¹, Estrella Rojo-Molinero⁴, Eduard Torrents⁵, Benito Almirante¹, Joan Gavaldà¹

- ¹ Laboratori de Malalties Infeccioses, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya.
- ² Departament de Microbiologia. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya.
- ³ Laboratori de *Biofilms* Microbians, Divisió de Malalties Infeccioses. Clínica Universitat de Navarra, Navarra, Espanya.
- ⁴ Servei de Microbiologia i Unitat d'Investigació. Hospital Universitari Son Espases. Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca, Espanya.
- ⁵ Laboratori d'Infeccions Bacterianes i Teràpies Antimicrobianes. Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Barcelona, Espanya.

Objectiu: Avaluar l'eficàcia de l'anidulafungina versus l'amfotericina B liposomal (LAmB) pel tractament d'infecció experimental de catèter enfront *Candida parapsilosis* mitjançant la tècnica de l'*antifungal-lock technique* (ALT).

Materials i mètodes: Es van estudiar dues soques clíniques de *C. parapsilosis* (CP12 i CP54). Es van realitzar estudis *in vitro* per a determinar les concentracions mínimes inhibidores de les biopel·lícules al 50 i 90% d'inhibició (CMIB₅₀ i CMIB₉₀) de l'anidulafungina i la LAmB mitjançant l'assaig de reducció de l'XTT en plaques de 96 pouets de poliestirè i en discos de silicona elastomer. Tanmateix, es va observar la viabilitat de les biopel·lícules crescudes sobre els discos de silicona i tractades amb anidulafungina i LAmB utilitzant el kit de tinció de Live/Dead®. Pel model *in vivo* es va implantar un catèter intravenós en els conills *White New Zealand*. La infecció va ser induïda pel bloqueig del catèter durant 48 hores amb 0,35 mL d'inòcul de la CP12 o la CP54. Els grups de tractament van consistir amb 48 hores d'ALT amb control (sèrum salí 0,9%), anidulafungina 3,33 mg/mL i LAmB 5,5 mg/mL.

Resultats: L'anidulafungina va presentar millor activitat *in vitro* que la LAmB enfront *C. parapsilosis* creixent en *biofilm* sobre discos de silicona: CMIB₉₀ de la LAmB (CP12, >1024 mg/L; CP54, >1024 mg/L) i CMIB₉₀ de l'anidulafungina (CP12, 1 mg/L; CP54, 1 mg/L; $p \leq 0.05$). Tanmateix, només l'anidulafungina (1 mg/L) va mostrar més del 90% de mortalitat cel·lular en els assajos de viabilitat de les biopel·lícules sobre discos de silicona i utilitzant tinció de Live/Dead®. En el cas de les plaques de 96 pouets de poliestirè, no es van observar diferències entre la sensibilitat *in vitro* de l'anidulafungina o la LAmB. En el model *in vivo*, l'anidulafungina va assolir reduccions significatives en comparació amb la LAmB en el recompte de log₁₀ d'unitats formadores de colònia (UFC) recuperades de les puntes del catèter en ambdues soques ($p \leq 0.05$). Tanmateix, només l'anidulafungina va obtenir negativització dels cultius de les puntes dels catèters (CP12 63%; CP54 73%; $p \leq 0.05$).

Conclusions: Els discos de silicona poden ser un substrat més fiable per l'estudi de sensibilitat *in vitro* de *C. parapsilosis* creixent en biopel·lícules. El tractament de l'*antifungal-lock technique* amb anidulafungina, va mostrar una major eficàcia per la infecció experimental de catèter vascular enfront soques de *C. parapsilosis*.

Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique

Jana Basas¹, Alba Morer¹, Carlos Ratia¹, María Teresa Martín², José Luis del Pozo³, Xavier Gomis¹, Estrella Rojo-Molinero⁴, Eduard Torrents⁵, Benito Almirante¹ and Joan Gavalda^{1*}

¹Infectious Diseases Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, VHIR, Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ²Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ³Infectious Disease Division, Laboratory of Microbial Biofilms, Clínica Universidad de Navarra, Navarra, Spain; ⁴Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca, Spain; ⁵Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Bacterial Infections and Antimicrobial Therapies, Barcelona, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-934894033; E-mail: joan.gavalda@vhir.org

Received 10 February 2016; returned 25 April 2016; revised 2 May 2016; accepted 24 May 2016

Objectives: The effectiveness of anidulafungin versus liposomal amphotericin B (LAmB) for treating experimental *Candida parapsilosis* catheter-related infection by an antifungal-lock technique was assessed.

Methods: Two clinical strains of *C. parapsilosis* (CP12 and CP54) were studied. *In vitro* studies were used to determine the biofilm MICs (MBIC₅₀ and MBIC₉₀) by XTT reduction assay and LIVE/DEAD biofilm viability for anidulafungin and LAmB on 96-well microtitre polystyrene plates and silicone discs. An intravenous catheter was implanted in New Zealand white rabbits. Infection was induced by locking the catheter for 48 h with the inoculum. The 48 h antifungal-lock treatment groups included control, 3.3 mg/mL anidulafungin and 5.5 mg/mL LAmB.

Results: Anidulafungin showed better *in vitro* activity than LAmB against *C. parapsilosis* growing in biofilm on silicone discs. MBIC₉₀ of LAmB: CP12, >1024 mg/L; CP54, >1024 mg/L. MBIC₉₀ of anidulafungin: CP12, 1 mg/L; CP54, 1 mg/L ($P \leq 0.05$). Moreover, only anidulafungin (1 mg/L) showed >90% non-viable cells in the LIVE/DEAD biofilm viability assay on silicone discs. No differences were observed between the *in vitro* susceptibility of anidulafungin or LAmB when 96-well plates were used. Anidulafungin achieved significant reductions relative to LAmB in log₁₀ cfu recovered from the catheter tips for both strains ($P \leq 0.05$). Only anidulafungin achieved negative catheter tip cultures (CP12 63%, CP54 73%, $P \leq 0.05$).

Conclusions: Silicone discs may be a more reliable substrate for the study of *in vitro* biofilm susceptibility of *C. parapsilosis*. Anidulafungin-lock therapy showed the highest activity for experimental catheter-related infection with *C. parapsilosis*.

Introduction

Candida is the fourth leading cause of healthcare-associated infections and the third most common cause of central line-associated bloodstream infections, with an incidence of candidaemia of 6.9 per 1000 ICU patients¹ and a mortality ranging between 40.2% and 56%.² Accounting for 23.7% of the isolates, *Candida parapsilosis* is the most common non-*albicans* species causing candidaemia in ICUs in Spain and Italy^{2,3} and is one of the most frequently implicated species in vascular catheter candidaemia,⁴ mainly in paediatric patients. The antifungal-lock technique combined with a conventional systemic antifungal is an effective treatment for long-term catheter-related bloodstream infections (CRBSIs), particularly for episodes caused by Gram-negative bacilli and CoNS.^{5,6} The

antifungal-lock technique involves instilling a high concentration of an antifungal agent into the catheter lumen and allowing it to remain for a designated period.⁷ The current recommendation for catheter- or device-related infections caused by *Candida* spp. is removal and replacement of the device.⁸ Nevertheless, the antifungal-lock technique has been considered to be a viable option, particularly in selected, haemodynamically stable patients with severe coagulopathy or with limited or no other alternatives for vascular access.⁶ No clinical trials have previously investigated the treatment with the antifungal-lock technique of CRBSIs with *Candida* spp., and the use of the antifungal-lock technique for *Candida* spp. has been described only rarely in paediatric case reports.^{9,10}

Echinocandins have emerged as important agents for the treatment of invasive candidiasis.¹¹ Anidulafungin shows potent

Basas et al.

and rapid *in vitro* and *in vivo* activity against *C. parapsilosis* biofilms;^{12,13} hence, it may be a suitable antifungal agent to use for an antifungal-lock technique approach, because this drug has been shown to induce fewer paradoxical growth effects than do caspofungin and micafungin.¹⁴ To our knowledge, no studies have been reported that evaluate the effectiveness of different antifungals using the antifungal-lock technique in catheter-related infection experimental models.

Candida spp. have been described to grow with different morphologies depending on the substrate to which they adhere.¹⁵ Different methodologies exist for the *in vitro* study of the antifungal susceptibility of microorganisms growing in biofilms, including the conventional technique (96-well microtitre polystyrene plates) and on distinct materials (silicone wafers, titanium plates, etc.).^{16,17} Therefore, the choice of substrates for biofilms growth may be important in *in vitro* susceptibility testing of biofilms of *Candida* spp.

The aims of this study are as follows. First, we sought to compare the *in vitro* susceptibility of liposomal amphotericin B (LAmB) and anidulafungin on *C. parapsilosis* biofilms growing on different substrates (96-well plates versus silicone discs). Second, we sought to compare the activity of LAmB versus anidulafungin for the treatment of experimental catheter-related *C. parapsilosis* infection with the antifungal-lock technique.

Materials and methods

Strains

Two well-characterized biofilm-producing *C. parapsilosis* strains were used (CP12 and CP54), both isolated from patients with CRBSIs. *C. parapsilosis* ATCC 22019 was used for quality control.

Antifungals

LAmB was provided by Gilead Sciences Inc. (Madrid, Spain), and anidulafungin was provided by Pfizer Inc. (Madrid, Spain). They were obtained in powder form and reconstituted with Antibiotic Medium No. 3 (Oxoid, UK) with 8% glucose for the *in vitro* tests. We selected clinically relevant concentration ranges of antifungals: 0.015–1024 mg/L for the susceptibility studies and 1 and 1024 mg/L for the morphology and yeast viability studies. For the *in vivo* animal model of infection, the concentrations were 5.5 mg/mL for LAmB and 3.3 mg/mL for anidulafungin. These concentrations were the highest that could be obtained commercially. Antifungal solutions were prepared according to the manufacturers' instructions.

In vitro studies

Susceptibility studies

A microdilution assay was used according to EUCAST¹⁸ to determine the MIC of the LAmB and anidulafungin. The ability of the CP12 and CP54 to develop biofilms was assessed using the method of Kamagata-Kiyoura et al.,¹⁹ with minor modifications. Biofilm MICs (MBICs) were determined at 50% and 90% inhibition (MBIC₅₀ and MBIC₉₀, respectively) by using the XTT reduction assay (Sigma–Aldrich Co., Madrid, Spain). We used two different material surfaces: 96-well microtitre polystyrene plates (Deltalab SL, Rubí, Spain) and silicone elastomer discs (15 mm diameter×1.5 mm; Merefasa SL, Barcelona, Spain).

For the experiment with XTT in the 96-well plates, we performed the protocol described by Pierce et al.,²⁰ with slight modifications. *C. parapsilosis* cells were grown overnight at 30°C in Yeast Nitrogen Base medium (Sigma–Aldrich Co., Madrid, Spain) with 50 mM dextrose (YNBD). The cultures were centrifuged and washed twice with sterile PBS, pH 7.2 (Merck, Darmstadt,

Germany). Each well was incubated with 100 µL of *C. parapsilosis* suspension at 37°C for 48 h with a final concentration of 1.0×10⁶ blastoconidia/mL in Antibiotic Medium No. 3 with 8% glucose. After 48 h, the wells were washed three times with PBS, the antifungal agents were added, and the plates were incubated at 37°C. After 48 h, the wells were again washed three times in PBS, and the plates were incubated at 37°C for 2 h with 100 µL of XTT–menadione solution (0.5 mg/mL XTT and 1 µM menadione). The resulting absorbance was read at 490 nm with an ELx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA) and the antimicrobial activity of each treatment was expressed as a relative percentage calculated as the absorbance of each treatment divided by the value for the negative controls.

For the experiment with XTT in the silicone discs, we followed the protocol described by Chandra et al.,¹⁷ with slight modifications. The *C. parapsilosis* cells were grown overnight in YNBD at 37°C. The cultures were centrifuged, washed twice with sterile PBS and then resuspended to a final concentration of 1.0×10⁷ blastoconidia/mL. Then, 4 mL of the culture was placed into each well of the 12-well plates and the silicone discs were added. The discs were incubated for 90 min at 37°C without shaking and were then transferred to a new plate, containing 4 mL of fresh YNBD. The plates were incubated at 37°C for 48 h while being shaken at 60 rpm. The silicone discs with the preformed biofilms were transferred to a new 12-well plate containing antifungal agents. Finally, silicone discs were placed in new 12-well plates with 4 mL of solution containing 50 µL of XTT (5 mg/mL in PBS) and 4 µL of the menadione stock solution (prepared as a 10 mM stock solution in 100% acetone). Plates were incubated at 37°C for 5 h while being shaken at 60 rpm. The resulting absorbance was read at 492 nm with a Smartspec™ Plus (Bio-Rad, Munich, Germany) spectrophotometer. The antimicrobial activity of each treatment was expressed as for the 96-well plates.

The lowest antifungal concentration that caused a ≥50% and ≥90% reduction in the metabolic activity of the biofilm compared with the negative control was determined and considered as MBIC₅₀ and MBIC₉₀, respectively.²¹

Morphology and yeast viability assay

To prepare biofilms on the silicone discs, yeast cells were cultured in Antibiotic Medium No. 3 with 8% glucose at 37°C while being shaken for 48 h, as described previously.¹⁷ Then, biofilms were treated for 48 h with LAmB or anidulafungin at 37°C. Afterwards, the biofilms were scraped from the individual wells into a new 12-well plate containing 1 mL of PBS in each well. For the assessment of the biofilm morphology and architecture, the cells were stained by using a drop of calcofluor white M2R (Sigma–Aldrich Co., Madrid, Spain.) for 1 min at room temperature.¹⁷

For the evaluation of live/dead cells, a LIVE/DEAD® BacLight™ viability kit (Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, the Netherlands) was used, which is also compatible for use with eukaryotic cells. We stained for 15 min at room temperature in the dark, as described previously.²² Live cells were stained with Syto 9 (3.34 mM solution in DMSO) combined with propidium iodide (20 mM solution in DMSO), which cannot permeate intact cell membranes and can be internalized only when the membrane is defective. Fluorescent cells were examined with a Nikon E600 microscope coupled with an Olympus DP72 camera.

In vivo studies

Animals

New Zealand white male rabbits (Granja Riera, Barcelona, Spain) weighing 2.0–2.2 kg were used for the *in vivo* experiments. Upon arrival, rabbits were housed in individual cages and provided with water and food *ad libitum* throughout the experiment.

Ethics

The experimental protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of our institution (registration number 73/12 CEEA) and

the Ministry of Environment of the Catalan Government (registration number 7863).

Animal model

Animals were anaesthetized by intramuscular injection of 100 mg/kg ketamine plus 20 mg/kg xylazine. A right laterocervical incision was made to expose the jugular vein bifurcation. The internal jugular vein was distally tied and catheterized with an 18 cm length of sterile silicone tubing (SILASTIC, ID/OD: 0.45/0.77 inch, Dow Corning Corporation, MI, USA). The catheter was inserted up to 8 cm to ensure positioning of the tip within the superior cava vein and was then secured with silk sutures. Patency was checked by drawing blood and flushing with sterile saline. The line was subcutaneously tunneled and brought to the interscapular region. The external portion of the catheter was connected to a removable hub (Vygon 1298.20, Laboratoires Pharmaceutiques Vygon, Ecoulen, France) attached to a disposable port (Sendal TP Inter Minisend, UK) and fixed to the skin.

After placement, the catheters were filled with both strains of *C. parapsilosis* suspensions prepared as follows: the strains were maintained frozen at -80°C and subcultured in Sabouraud (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) plus 8% dextrose for 48 h. Cells from the subculture were suspended in Antibiotic Medium No. 3 with 8% glucose to obtain a final concentration of 1.0×10^7 blastoconidia/mL; 0.35 mL of this suspension was used to fill the catheter. This is the amount necessary to fill the entire internal surface of the catheter. The inoculum was locked in the lumen of the catheter for a period of 48 h.

Treatment groups and estimation of therapeutic efficacy

Immediately before the start of the antifungal-lock technique, the inoculum was carefully withdrawn by aspiration. The disposable port and hub were replaced with new devices. Animals were then randomized into the following three groups: untreated control (serum saline), 5.5 mg/mL LAmB, or 3.3 mg/mL anidulafungin. Catheters were filled with 0.4 mL of sterile saline or antifungal solution as appropriate and locked for another 48 h. All locks were supplemented with 100 IU of sodium heparin/mL.⁸

At the end of the treatment period, the animals were euthanized with intravenous pentobarbital. The catheters were removed and the distal 4 cm of each catheter was cut for quantitative culture. The lumens of the catheter segments were gently flushed twice with 2 mL of brain heart infusion medium (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) to ensure antifungal removal, and then the catheter segments were bisected lengthwise, submerged in 4 mL of brain heart infusion medium and sonicated at 50 Hz for 10 min. The flushing and sonication products were washed twice by centrifugation, resuspended in brain heart infusion medium and serially diluted, plated onto Sabouraud agar plates and incubated for 48 h at 37°C . After incubation, colony counts were performed. The results were expressed in \log_{10} total cfu.

Statistical analysis

For statistical purposes, the catheters yielding a negative result were recorded as having one colony. The percentage of negative cultures obtained in each treatment arm was compared using Fisher's exact test, and the \log_{10} cfu recovered from the catheter tips was compared using the Mann-Whitney test. *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

The *in vitro* results (Table 1) showed that the planktonic *C. parapsilosis* isolates used in our study were highly susceptible to the antifungal agents tested. Both strains were susceptible to LAmB (CP12, 0.5 mg/L; CP54, 0.25 mg/L) and anidulafungin (CP12, 0.5 mg/L; CP54, 0.25 mg/L). In addition, no differences were observed between the activity of LAmB or anidulafungin against *C. parapsilosis* biofilms growing on 96-well polystyrene plates; MBIC₅₀/MBIC₉₀: LAmB (CP12 2/16 mg/L; CP54 2/8 mg/L) and anidulafungin (CP12 2/8 mg/L; CP54 2/4 mg/L). However, anidulafungin showed better activity against *C. parapsilosis* biofilms growing on silicone discs, especially in the MBIC₉₀ values (>1000 -fold relative to the activity of LAmB) compared with LAmB (CP12 >1024 mg/L; CP54 >1024 mg/L) and anidulafungin (CP12 1 mg/L, $P \leq 0.05$; CP54 1 mg/L, $P \leq 0.05$). In our *in vitro* studies, anidulafungin demonstrated better activity against *C. parapsilosis* biofilms growing on silicone discs than LAmB, which exerted a limited effect.

The microscopic morphology of CP12 biofilm growing on silicone discs stained with calcofluor white and treated with 1024 mg/L ($< \text{MBIC}_{90}$) of LAmB showed predominantly small and ovoid colonies, similarly to the non-treated biofilm. In contrast, biofilm treated with 1 mg/L (MBIC₉₀) or 1024 mg/L anidulafungin was composed of a large and globose morphology, probably indicating severe disturbances in the cell wall and to the yeast physiology (Figure 1a). LIVE/DEAD staining (Figure 1b) revealed that CP12 and CP54 and biofilms growing on silicone discs in the presence of anidulafungin showed distinct differences in biofilm cell death compared with control or LAmB. Anidulafungin 1 mg/L caused increased cell and hyphal death (red colour in LIVE/DEAD staining). In sharp contrast to LAmB and non-treated groups, biofilms treated with 1 mg/L anidulafungin had almost no live cells, indicating that the yeast cell viability and its contribution to biofilm viability was substantially compromised. In contrast, the addition of 1–1024 mg/L LAmB indicated that significant reduction in the cell viability of $>90\%$ was not achieved, which correlated with our MBIC results shown in Table 1.

Table 1. *In vitro* susceptibility of *C. parapsilosis* strains to LAmB and anidulafungin in different materials (polystyrene and silicone)

Strain	LAmB				Anidulafungin					
	MIC (mg/L)	MBIC ₅₀ (mg/L)		MBIC ₉₀ (mg/L)		MIC (mg/L)	MBIC ₅₀ (mg/L)		MBIC ₉₀ (mg/L)	
		96-well plate	silicone discs	96-well plate	silicone discs		96-well plate	silicone discs	96-well plate	silicone discs
CP12	0.5	2	1	16	>1024	0.5	2	0.25	8	1 ^a
CP54	0.25	2	0.5	8	>1024	0.25	2	0.125	4	1 ^a

^a $P \leq 0.05$ versus MBIC₉₀ of LAmB in silicone discs.

Basas et al.

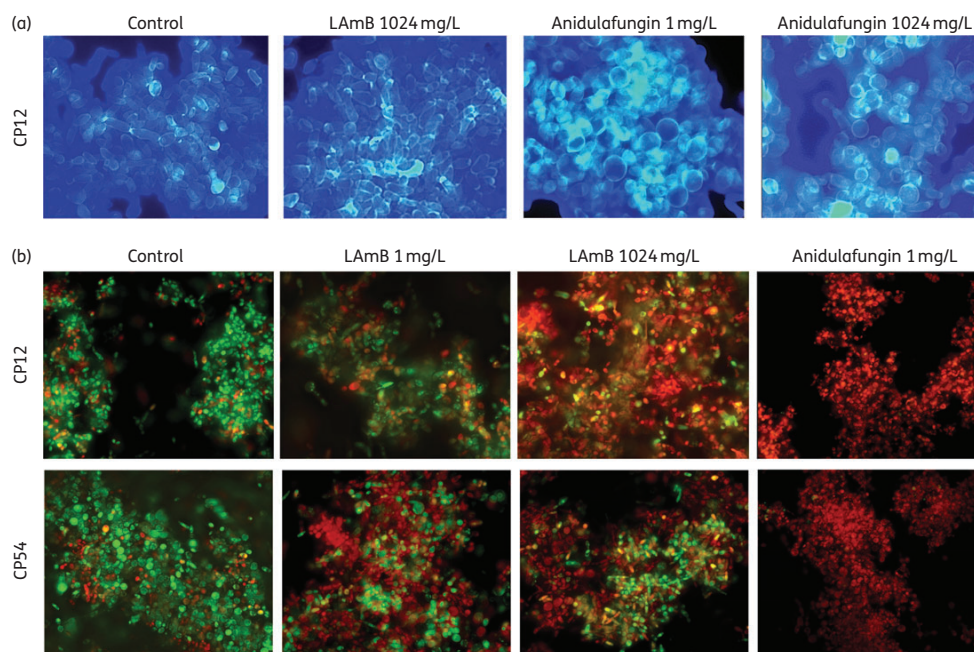


Figure 1. Morphology and yeast viability assay of *C. parapsilosis* biofilm. (a) Morphology of *C. parapsilosis* CP12. Twelve biofilms were grown for 48 h at 37°C on silicone discs and stained with calcofluor white. Groups: untreated control, 1024 mg/L LAmB, 1 mg/L anidulafungin and 1024 mg/L anidulafungin. (b) LIVE/DEAD fluorescence imaging of *C. parapsilosis* CP12 and *C. parapsilosis* CP54. Biofilms were grown for 48 h at 37°C on silicone discs showing vital live cells (green) versus dead cells (red) stained with Syto 9 and propidium iodide.

Table 2. Antifungal-lock therapy results for *C. parapsilosis* CP12 and *C. parapsilosis* CP54

Treatment	CP12		CP54	
	negative cultures/total (%)	log ₁₀ total cfu, median (IQR)	negative cultures/total (%)	log ₁₀ total cfu, median (IQR)
Control	0/8 (0)	4.76 (2.4–5.4)	0/8 (0)	4.64 (3.56–6.01)
LAmB (5.5 mg/mL)	3/10 (30)	3.04 (0–3.86) ^b	1/6 (17)	2.07 (1.11–3.52) ^b
Anidulafungin (3.3 mg/mL)	5/8 (63) ^a	0 (0–1.17) ^a	8/11 (73) ^a	0 (0–0.69) ^a

^a $P \leq 0.05$ versus control and LAmB.

^b $P \leq 0.05$ versus control.

The results obtained from the rabbit catheter tip cultures after sonication and centrifugation are shown in Table 2. Compared with controls, 3.3 mg/mL anidulafungin achieved a significant reduction of more than 4 log₁₀ cfu recovered from the catheter tips in CP12 (4.76 log₁₀ cfu, $P \leq 0.05$) and CP54 (4.64 log₁₀ cfu, $P \leq 0.05$) at 48 h. Colony counts were significantly lower in animals treated with 3.3 mg/mL anidulafungin-lock therapy than those with 5.5 mg/mL LAmB lock (CP12 and CP54; both $P \leq 0.05$). Notably, 3.3 mg/mL anidulafungin was the only antifungal achieving a significant percentage of negative catheter cultures in both strains after 48 h of antifungal-lock: 63% in CP12 (controls 0%, 5.5 mg/mL LAmB 30%, $P \leq 0.05$) and 73% in CP54 (controls 0%, 5.5 mg/mL LAmB 17%, $P \leq 0.05$).

Discussion

This study had two aims. First, the *in vitro* susceptibility of LAmB and anidulafungin on *C. parapsilosis* biofilms growing on different substrates was assessed; and second, the effectiveness of anidulafungin versus LAmB for the treatment of experimental *C. parapsilosis* catheter-related infection was assessed using the antifungal-lock technique.

Focusing on the *in vitro* assays, our results showed that anidulafungin was more effective than LAmB against *C. parapsilosis* biofilms growing on silicone discs, and there was no correlation between the susceptibility in 96-well polystyrene plates and silicone discs. These results support the use of silicone discs, which

are composed of the same substrate as used in catheters. Focusing on the *in vivo* effects, the anidulafungin-lock therapy showed higher negative catheter-culture rates and negative tip cultures compared with LAmB, which showed only marginal reductions in the percentages.

Rapid clearance of the pathogen from an infected central venous catheter is likely to be clinically important, especially in the case of *C. parapsilosis*, if this allowed the catheter to be kept in place. This effect was obtained with 3.3 mg/mL anidulafungin-lock therapy for 48 h in our model. In contrast, although LAmB decreased the fungal load in the catheter tips, this effect was lower than that achieved by anidulafungin, and the reduction in the rate was minimal. The *in vivo* animal models of the antifungal-lock technique reported to date have used lock strategies against *Candida albicans* biofilms.⁷ In contrast to earlier findings, which have suggested no differences between the antifungal-lock technique with caspofungin or LAmB,⁷ in our model of the antifungal-lock technique, the behaviour of the *C. parapsilosis* growing on the biofilms on the catheters was paradoxical with regard to the results for LAmB compared with anidulafungin.

The use of 96-well polystyrene plates to test antifungal susceptibility *in vitro* had similar outcomes for the LAmB and anidulafungin, showing these plates are not a good substrate for use in testing antifungal therapies for medical purposes. However, significantly better outcomes were obtained for anidulafungin compared with LAmB when silicone discs were used. Moreover, higher concentrations of the LAmB were required to inhibit the growth of the *Candida* biofilms than planktonic growth, whereas anidulafungin preserved its activity against biofilms. The material to which the yeast attaches and develops into mature biofilms can play a role in all of the most important factors related to the susceptibility to infection, including yeast adhesion.^{23–25} Considering our data, the use of silicone for *in vitro* studies that evaluate the susceptibility of antifungals against *C. parapsilosis* growing in biofilms would be recommended given that it is the same material used in clinical settings.

Two classes of antifungal agents, the lipid formulations of amphotericin and the echinocandins, appear to have unique activities against *Candida* spp. biofilms.^{26,27} Previously, Toulet *et al.*²⁸ have shown that LAmB at 1000 mg/L does not eradicate mature biofilms. Moreover, they have found less of an effect of LAmB on *C. parapsilosis* biofilm than on *C. albicans* or *Candida glabrata* biofilms. Our results confirm these reported differences; we also found that LAmB exhibited higher MBEC₉₀ with silicone discs (>1024 mg/L) for both strains tested, indicating that biofilms were resistant to this treatment and were completely dependent on biofilm substrate for growth. In contrast, Toulet *et al.*²⁸ have found that anidulafungin eradicates *C. parapsilosis* biofilm, either *in vitro* or *in vivo*. These results are completely consistent with those obtained in the present study and suggest that the results of echinocandins, particularly anidulafungin, are better than for LAmB in *in vitro* studies.²⁹

The resistance mechanisms of *C. parapsilosis* to amphotericin B are unknown. In contrast, the resistance mechanisms of *C. albicans* biofilms to amphotericin B have been studied; however, no studies exist for lipid formulations of amphotericin B.³⁰

The ergosterol content of yeast cells during late biofilm growth is reduced; moreover, mature biofilms are less dependent on ergosterol for maintaining membrane fluidity. This effect potentially limits the efficacy of ergosterol-targeting drugs, such as amphotericin B.³¹ In addition, the extracellular matrix helps to

preserve the *Candida* spp. biofilm architectural integrity and contributes to the resistance of these to antifungals. Data have now indicated that β -1,3-D-glucan, a principal structural component of fungal cell walls,³⁰ retains amphotericin B, and therefore reduces the exposure of the yeast cells to the amphotericin B and the elicitation of cellular responses.^{32,33} Finally, LaFleur *et al.*³⁴ have demonstrated the existence of persister cells within amphotericin B-treated *C. albicans* biofilms.

Anidulafungin treatment in *C. parapsilosis* strains produces cells with deformed morphology. This effect is related to the mode of action of echinocandins that inhibit β -1,3-D-glucan synthase, which is responsible for the biosynthesis of β -1,3-D-glucan. As reported by Jin *et al.*,³⁵ several dyes, such as FUN-1, are used for yeast imaging and quantification. Nevertheless, these authors have noted that this dye may overestimate the living cells, particularly when cell density is high. These results are consistent with those from other studies and suggest that the combination of Syto 9 and propidium iodide dyes facilitates easy imaging of viable cells by fluorescence microscopy in *Candida* spp. biofilms.³⁵ Our results of the metabolic activity and vitality using XTT assay and of the cell viability by fluorescence imaging using a mixture of Syto 9 and propidium iodide dyes confirmed the efficacy of anidulafungin versus LAmB against *C. parapsilosis* growing in biofilms on silicone discs.

Little has been published on the conservative management in humans of *Candida* spp. CRBSIs. Although the safest option recognized for these patients is the removal of the catheter, this measure is not always possible (e.g. when there is a lack of alternative venous access, there is significant bleeding diathesis, or there are quality-of-life issues that take priority over the need for reinsertion of a new catheter at another site).⁸ Even in paediatric patients, in whom it is sometimes very difficult to establish a central line, some authorities have recommended trying *in situ* treatment for 72 h when the patient shows no clinical deterioration.¹⁰ Whether the extension of the antifungal-locking period improves the efficacy of the technique as suggested by some clinical reports of catheters salvaged using amphotericin B deoxycholate in selected cases of *C. parapsilosis* infection^{9,10} has not yet been determined. The single report of echinocandin-lock therapy in the literature has described the effectiveness of caspofungin to treat *Candida lipolytica* catheter-related infection,³⁶ and this treatment was established for 14 days. We consider 48 h of treatment to be the turning point to clinically maintain long-term outcomes and avoid possible complications of infection, and in the present study, anidulafungin treatment at 3.3 mg/mL achieved a higher percentage of negative catheter tip cultures at that timepoint.

In conclusion, this study demonstrated that silicone discs might be a more reliable substrate to perform *in vitro* biofilm susceptibility studies of *C. parapsilosis*. Moreover, anidulafungin using the antifungal-lock technique provides a rapid decrease in biofilm-embedded *C. parapsilosis* and achieves negative catheter tip cultures in 48 h for the majority of episodes. The results of this study support the use of anidulafungin-lock therapy as an adjunctive therapeutic option for the systemic treatment in selected cases of long-term CRBSIs with *C. parapsilosis*.

Acknowledgements

This study was partially presented at the Twenty-second European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, UK, 2012 (Oral

Basas et al.

Session: O116) and at the Nineteenth Congress of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sevilla, Spain, 2015 (Oral Session: O50).

We would like to acknowledge the professional manuscript services of Nature Publishing Group, Language Editing. This work has been conducted within the framework of the Doctorate in Medicine from the Universitat Autònoma de Barcelona.

Funding

This study was supported by research grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS 80554) and was co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) and Pfizer Inc.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Cornely OA, Bassetti M, Calandra T et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 19–37.
- Puig-Asensio M, Peman J, Zaragoza R et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med* 2014; **42**: 1423–32.
- Bassetti M, Righi E, Costa A et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 21.
- Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: O245–54.
- Fernandez-Hidalgo N, Almirante B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; **12**: 117–29.
- Lebeaux D, Fernandez-Hidalgo N, Chauhan A et al. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis* 2014; **14**: 146–59.
- Walraven CJ, Lee SA. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1–8.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 1–45.
- Blackwood RA, Klein KC, Micel LN et al. Ethanol locks therapy for resolution of fungal catheter infections. *Pediatr Infect Dis J* 2011; **30**: 1105–7.
- Castagnola E, Marazzi MG, Tacchella A et al. Broviac catheter-related candidemia. *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24**: 747–.
- Walsh TJ. Echinocandins—an advance in the primary treatment of invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2002; **347**: 2070–2.
- Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 357–60.
- Kucharkova S, Sharma N, Spriet I et al. Activities of systemically administered echinocandins against in vivo mature *Candida albicans* biofilms developed in a rat subcutaneous model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2365–8.
- Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B et al. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; **27**: 127–31.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP et al. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005; **4**: 633–8.
- Cihlar RL, Calderone RA. *Candida albicans Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, 2009.
- Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1909–24.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: E246–7.
- Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H et al. Detachment activity of human saliva in vitro for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate. *J Infect Chemother* 2003; **9**: 215–20.
- Pierce CG, Uppuluri P, Tummala S et al. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J Vis Exp* 2010; **44**: 2287.
- Kuhn DM, George T, Chandra J et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1773–80.
- Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 2011; **49**: 253–62.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; **70**: 878–88.
- Rochford ET, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 1162–7.
- Cuellar-Cruz M, Vega-Gonzalez A, Mendoza-Novelo B et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**: 2513–27.
- Cateau E, Rodier MH, Imbert C. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 153–5.
- Guembe M, Guinea J, Marcos-Zambrano LJ et al. Micafungin at physiological serum concentrations shows antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5581–4.
- Toulet D, Debarre C, Imbert C. Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 430–2.
- Fiori B, Posteraro B, Torelli R et al. In vitro activities of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3031–5.
- Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; **1354**: 1–11.
- Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM et al. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology* 2003; **149**: 261–7.
- Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to β -glucans. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2096–111.

2900

Anidulafungin antifungal-lock technique in *C. parapsilosis* catheter-related infection

JAC

33 Nett J, Lincoln L, Marchillo K et al. Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 510–20.

34 LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3839–46.

35 Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH et al. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2005; **159**: 353–60.

36 Ozdemir H, Karbuz A, Ciftci E et al. Successful treatment of central venous catheter infection due to *Candida lipolytica* by caspofungin-lock therapy. *Mycoses* 2011; **54**: e647–9.

TREBALL 3: Una dosi elevada de daptomicina és efectiva com a *antibiotic lock therapy* en un model en conill d'infecció de catèter per *Staphylococcus epidermidis*

Títol original: “High-dose daptomycin is effective as an antibiotic lock therapy in a rabbit model of *Staphylococcus epidermidis* catheter-related infection”

Autors: Jana Basas¹, Marta Palau¹, Carlos Ratia¹, José Luis Del Pozo², María Teresa Martín-Gómez³, Xavier Gomis¹, Eduard Torrents⁴, Benito Almirante¹, Joan Gavaldà¹

¹ Laboratori de Malalties Infeccioses, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya.

² Laboratori de *Biofilms* Microbians, Divisió de Malalties Infeccioses. Clínica Universitat de Navarra, Navarra, Espanya

³ Departament de Microbiologia. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya.

⁴ Laboratori d'Infeccions Bacterianes i Teràpies Antimicrobianes. Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Barcelona, Espanya

Objectiu: Avaluar l'eficàcia de la daptomicina i la vancomicina enfront dues soques de *Staphylococcus epidermidis* en un model de conill d'infecció relacionada amb el catèter mitjançant la tècnica de l'*antibiotic lock technique* (ALT).

Materials i mètodes: Es van estudiar dues soques clíniques de *S. epidermidis* (SE14 i SE94). Es van realitzar estudis *in vitro* per determinar les concentracions mínimes eradicadores del *biofilm* al 90% (CMEB₉₀) en discos de silicona elastomer i després de 24 hores de tractament amb vancomicina i daptomicina. Es va utilitzar la viabilitat bacteriana visualitzada mitjançant microscopi confocal (CLSM) per analitzar la proporció de bactèries vives/mortes a les biopel·lícules. Pel model *in vivo* es va implantar un

catèter intravenós en els conills *White New Zealand*. La infecció va ser induïda pel bloqueig del catèter durant 24 hores amb 0,35 mL d'inòcul de la SE14 o la SE94 i posteriorment 24 hores més amb sèrum salí 0,9%. Els grups de tractament van consistir amb 24 i 72 hores d'ALT amb control (sèrum salí 0,9%), daptomicina (5 i 50 mg/mL) i vancomicina (10 mg/mL).

Resultats: La daptomicina va presentar millor activitat *in vitro* que la vancomicina enfront *S. epidermidis* creixent en *biofilm* sobre discos de silicona: (CMEB₉₀ de vancomicina i daptomicina per SE14, 10.000 i 1024 mg/L; SE94, >10.000 i 1024 mg/L). Amb la visualització del CLSM, la daptomicina 50 mg/mL va presentar una reducció significativa ($p \leq 0.05$) del percentatge de cèl·lules vives en comparació amb els altres grups de tractament. Dels resultats *in vivo*: el tractament ALT amb daptomicina 5 mg/mL va assolir disminuir significativament el recompte de \log_{10} d'UFC recuperades de les puntes del catèter en ambdues soques ($p \leq 0.05$) respecte el control i la vancomicina 10 mg/mL a les 72 hores de tractament. La daptomicina 50 mg/mL va obtenir una reducció significativa ($p \leq 0.001$) tant del recompte de \log_{10} d'UFC com del percentatge de negativització de les puntes dels catèters enfront les dues soques de *S. epidermidis*, tant a les 24 com a les 72 hores de tractament, en comparació amb els altres grups de tractament.

Conclusions: Utilitzar una alta concentració de daptomicina (50 mg/mL) pel tractament d'*antibiotic lock technique* pot oferir una avantatge terapèutica per la infecció de catèter de llarga durada causada per *S. epidermidis*.



High-Dose Daptomycin Is Effective as an Antibiotic Lock Therapy in a Rabbit Model of *Staphylococcus epidermidis* Catheter-Related Infection

Jana Basas,^a Marta Palau,^a Carlos Ratia,^a José L. del Pozo,^b María Teresa Martín-Gómez,^c Xavier Gomis,^a  Eduard Torrents,^d Benito Almirante,^a Joan Gavalda^a

^aAntimicrobial Resistance Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^bInfectious Disease Division, Internal Medicine Department, Clínica Universitaria de Navarra, Navarra, Spain

^cMicrobiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^dInstitute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Bacterial Infections and Antimicrobial Therapies, Barcelona, Spain

ABSTRACT Long-term catheter-related bloodstream infections (CRBSIs) involving coagulase-negative staphylococci are associated with poor patient outcomes, increased hospitalization, and high treatment costs. The use of vancomycin lock therapy has been an important step forward in treatment of these biofilms, although failures occur in 20% of patients. In this study, we report that a high dose of daptomycin lock therapy may offer a therapeutic advantage for these CRBSIs in just 24 h of treatment.

KEYWORDS catheter-related infection, daptomycin, animal model, antibiotic lock therapy, coagulase-negative staphylococci, *S. epidermidis*

Bloodstream infections (BSIs) are a common complication of central venous catheters (CVCs), with incidence rates of 2.9 to 11.3 cases per 1,000 days of CVC use (1). The main microorganisms that cause long-term catheter-related BSIs (CRBSIs) are coagulase-negative staphylococci (CoNS), which account for ~30% of health care-associated BSIs (2–5). The pathogenic property of CoNS is related mainly to their ability to form an adherent biofilm on the surface of indwelling medical devices (6). Antibiotic lock therapy (ALT) using vancomycin lock therapy (LT) is recommended in cases of uncomplicated CRBSIs caused by CoNS (7). Moreover, this treatment fails in the form of relapse in 20% of episodes, so new therapeutic alternatives need to be explored as elective therapies (2). Daptomycin has demonstrated high *in vitro* efficacy against staphylococcal biofilms because of rapid penetration into the matrix of the biofilm (8, 9).

ALT regimens last 14 days, resulting in reduced access to the device. Moreover, there are patients with no other available vascular access who urgently need vascular access and benefit from a shorter treatment period. Given the clinical importance of finding a faster and more effective ALT treatment to enable earlier access to the long-term catheter, thereby improving patient outcomes, reducing the risk of resistance, and preventing infection-related sequelae, the aim of this study was to compare the activity of vancomycin and different concentrations of daptomycin for the treatment of experimental *Staphylococcus epidermidis* catheter-related infection using ALT in a rabbit model.

The MICs of vancomycin and daptomycin against two strains of *S. epidermidis* (SE14 and SE94) were determined with the broth microdilution method according to EUCAST (10). Both strains were susceptible to vancomycin and daptomycin. To analyze the susceptibility on biofilm formation, we followed the protocol described by Chandra et al. (11). We found that minimum biofilm eradication concentrations at 90% (MBEC_{90S})

Received 28 August 2017 Returned for modification 9 October 2017 Accepted 11 November 2017

Accepted manuscript posted online 20 November 2017

Citation Basas J, Palau M, Ratia C, del Pozo JL, Martín-Gómez MT, Gomis X, Torrents E, Almirante B, Gavalda J. 2018. High-dose daptomycin is effective as an antibiotic lock therapy in a rabbit model of *Staphylococcus epidermidis* catheter-related infection. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01777-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01777-17>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Joan Gavalda, joan.gavalda@vhir.org.

B.A. and J.G. contributed equally to this work.

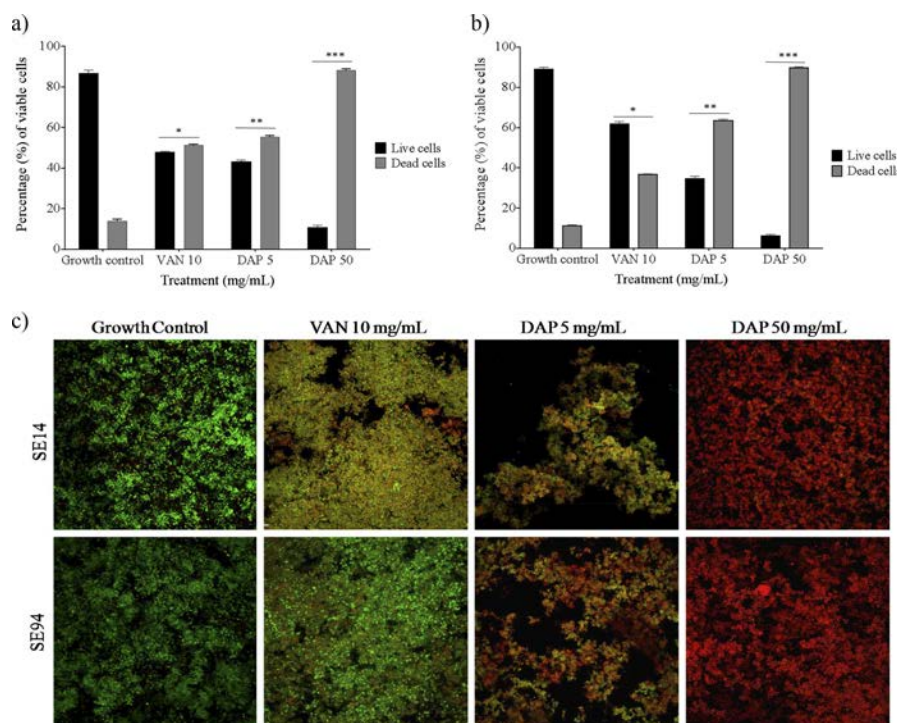


FIG 1 Activity of vancomycin and daptomycin in silicone discs against *S. epidermidis* strains SE14 (a) and SE94 (b) after 24 h of treatment. VAN, vancomycin; DAP, daptomycin. *, $P \leq 0.05$ versus control. **, $P \leq 0.05$ versus control and VAN 10 mg/ml. ***, $P \leq 0.05$ versus control, VAN 10 mg/ml, and DAP 5 mg/ml. (c) *S. epidermidis* stained with LIVE/DEAD BacLight viability kit to directly visualize the effect of the antibiotics tested. Red fluorescence, dead cells; green fluorescence, live cells (visualized at $\times 60$ magnification).

of vancomycin for the SE14 and SE94 biofilms growing in silicone discs were 10,000 and $>10,000$ mg/liter, respectively, and the MBEC₉₀₅ of daptomycin were 1,024 mg/liter for both strains. Our *in vitro* studies indicated that daptomycin exhibited better *in vitro* activity than vancomycin against the *S. epidermidis* biofilm. Unlike daptomycin, vancomycin diffused slowly into the deeper layers of the biofilm, and the biofilm bacteria showed decreased sensitivity to vancomycin (12).

To measure the effect of vancomycin 10 mg/ml and daptomycin 5 and 50 mg/ml on *S. epidermidis* biofilm, growth on silicone discs was visualized with confocal laser scanning microscopy (CLSM) using LIVE/DEAD staining to distinguish between dead cells and live cells. As shown in Fig. 1a and b, daptomycin 50 mg/ml significantly reduced the number of live cells; in contrast, dead cells increased in the other treatments. Moreover, the effect of the treatments visualized with CLSM revealed that both strains treated with daptomycin at a high concentration had a bacterial mortality of $>90\%$ (Fig. 1c). The differences between the results of colony counts and viability using CLSM indicated that some samples contained viable but nonculturable (VBNC) cells. The possible recurrence of staphylococci infections related to medical devices may be caused for this VBNC (13).

Following methodology used in our previous studies of ALT therapy for catheter-related infection (14), after 48 h infection with an inoculum of 10^8 CFU/ml of SE14 or SE94, treatments with vancomycin 10 mg/ml and daptomycin 5 and 50 mg/ml were analyzed using the percentage of negative cultures and the log₁₀ CFU (mean \pm SD; 95% confidence interval [CI]) recovered from the catheter-tip cultures (Table 1). Higher

TABLE 1 Antibiotic lock therapy results for *S. epidermidis* SE14 and SE94 at 24 and 72 h

Antibody lock therapy, by strain ^a	Results at indicated follow-up time			
	24 h		72 h	
	Negative/total cultures (%)	Log ₁₀ total CFU (mean ± SD [95% CI])	Negative/total cultures (%)	Log ₁₀ total CFU (mean ± SD [95% CI])
<i>S. epidermidis</i> SE14				
Control	0/10 (0)	6.3 ± 0.6 (5.8–6.7)	0/13 (0)	5.6 ± 1.1 (4.9–6.2)
DAP 50 mg/ml	12/14 (86) ^b	0.1 ± 0.3 (0.0–0.3) ^b	13/14 (93) ^c	0.1 ± 0.3 (0.0–0.3) ^c
DAP 5 mg/ml	0/13 (0)	1.4 ± 0.4 (1.2–1.7) ^c	11/15 (73) ^c	0.3 ± 0.3 (0.1–0.4) ^c
VAN 10 mg/ml	0/10 (0)	3.8 ± 0.9 (3.2–4.5) ^d	2/14 (14)	2.4 ± 1.5 (1.6–3.3) ^d
<i>S. epidermidis</i> SE94				
Control	0/10 (0)	5.5 ± 1.0 (4.8–6.3)	0/12 (0)	5.6 ± 0.5 (5.3–6)
DAP 50 mg/ml	12/13 (92) ^b	0.1 ± 0.2 (0.0–0.2) ^b	11/14 (79) ^c	0.4 ± 1.0 (0.0–1.0) ^c
DAP 5 mg/ml	0/10 (0)	1.7 ± 0.3 (1.4–1.9) ^c	6/11 (55) ^f	1.3 ± 1.6 (0.2–0.4) ^{d,e}
VAN 10 mg/ml	0/10 (0)	4.4 ± 1.0 (3.7–5.1) ^d	1/12 (8)	2.9 ± 1.3 (2.0–3.7) ^d

^aDAP, daptomycin; VAN, vancomycin.^b*P* ≤ 0.001 versus control, VAN 10 mg/ml and DAP 5 mg/ml.^c*P* ≤ 0.001 versus control and VAN 10 mg/ml.^d*P* ≤ 0.001 versus control.^e*P* ≤ 0.05 versus VAN 10 mg/ml.^f*P* ≤ 0.05 versus control.

concentrations of vancomycin were not used because of the precipitation of the drug (15). After 24 h of LT with daptomycin 50 mg/ml, the colony counts recovered from the catheter-tip cultures were significantly lower than those treated with vancomycin or daptomycin 5 mg/ml (*P* ≤ 0.001). Of note, daptomycin 50 mg/ml was the only LT that achieved a significant percentage of negative catheter-tip cultures in both strains after 24 h. At 72 h, no difference was seen between the two daptomycin doses, which were more effective than the vancomycin locks. This suggests that daptomycin at high concentrations rapidly penetrates the biofilm layer, thus reducing both the length and frequency of ALT with a rapid salvage of CVCs.

Clinical use of daptomycin LT for the treatment of CoNS-associated CRBSIs is scarce (16, 17). Therefore, global results from the few clinical cases in which daptomycin 5 mg/ml was used as ALT are similar to those with vancomycin, with a failure rate of close to 20% to 25%. However, in our results, a high therapeutic dose of daptomycin resulted in statistically significant reductions of catheter bacterial loads and negativization of catheter tips in just 24 h of treatment. That difference can be translated to superior efficacy in clinical practice, including a reduction in the duration of treatment or prevention of the spread of persistent cells.

In conclusion, daptomycin LT at high concentrations may be a promising treatment for CoNS-associated CRBSIs, offering a therapeutic advantage over low concentrations of daptomycin or vancomycin, thus warranting further consideration and clinical studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by the European Regional Development Fund (ERDF), Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

We acknowledge the professional manuscript services of Nature Publishing Group, Language Editing.

This work was conducted within the framework of the Doctorate in Medicine from the Universitat Autònoma de Barcelona.

We have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA. 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections, U.S. Pediatrics 110:e51.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK. 2009. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 49:1–45. <https://doi.org/10.1086/599376>.
- Fernandez-Hidalgo N, Almirante B, Calleja R, Ruiz I, Planes AM, Rodriguez

- D, Pigrau C, Pahissa A. 2006. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother* 57:1172–1180. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl103>.
4. Rupp ME. 2013. Clinical characteristics of infections in humans due to *Staphylococcus epidermidis*, p 1–16. In Fey PD (ed), *Staphylococcus epidermidis* methods and protocols. Springer, Omaha, NE.
 5. Otto M. 2014. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1106:17–31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-736-5_2.
 6. Mack D, Davies AP, Harris L, Jeeves R, Pascoe B, Knoblock JM, Rohde H, Wilkinson TS. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in biomaterial-associated infection. Springer, New York.
 7. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Hola V, Imbert C, Kirketerp-Moller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C, ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. 2015. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 21(Suppl 1):S1–S25.
 8. LaPlante KL, Rybak MJ. 2004. Daptomycin—a novel antibiotic against Gram-positive pathogens. *Expert Opin Pharmacother* 5:2321–2331. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.11.2321>.
 9. Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. 2009. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3505–3507. <https://doi.org/10.1128/AAC.01728-08>.
 10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2016. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 6.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf.
 11. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2008. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc* 3:1909–1924. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.192>.
 12. Mascio CT, Alder JD, Silverman JA. 2007. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4255–4260. <https://doi.org/10.1128/AAC.00824-07>.
 13. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F. 2012. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Microbiol Infect* 18:E259–E261. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03893.x>.
 14. Meije Y, Almirante B, Del Pozo JL, Martin MT, Fernandez-Hidalgo N, Shan A, Basas J, Pahissa A, Gavalda J. 2014. Daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a model of *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Infect* 68:548–552. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.01.001>.
 15. Del Pozo JL. 2009. Role of antibiotic lock therapy for the treatment of catheter-related bloodstream infections. *Int J Artif Organs* 32:678–688.
 16. Tatarelli P, Parisini A, Del Bono V, Mikulska M, Viscoli C. 2015. Efficacy of daptomycin lock therapy in the treatment of bloodstream infections related to long-term catheter. *Infection* 43:107–109. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0675-4>.
 17. Del Pozo JL, Rodil R, Aguinaga A, Yuste JR, Bustos C, Montero A, Espinosa G, Garcia-Fernandez N. 2012. Daptomycin lock therapy for grampositive long-term catheter-related bloodstream infections. *Int J Clin Pract* 66:305–308. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02830.x>.

VII. DISCUSSIÓ

VII. DISCUSSIÓ

Una de les característiques més importants dels microorganismes involucrats en les infeccions dels dispositius biomèdics i, en concret, dels catèters vasculars, és la seva habilitat de formar *biofilms* i el seu paper en la tolerància als tractaments antimicrobians convencionals, ja que són molt més resistents que les cèl·lules planctòniques homòlogues (281).

Discussió dels estudis de *Candida* spp.

Un dels objectius del primer treball es va centrar en avaluar, per una part, la sensibilitat *in vitro* de l'amfotericina B liposomal i l'anidulafungina en diferents substrats de formació de les biopel·lícules de *C. parapsilosis* (plaques de poliestirè *versus* discos de silicona mèdica). Els resultats obtinguts van mostrar que no hi havia diferències entre l'activitat de la LAmB i l'anidulafungina enfront *C. parapsilosis* creixent en biopel·lícules sobre plaques de poliestirè. Contràriament, la biopel·lícula desenvolupada sobre discos de silicona, sí que va mostrar diferències entre les sensibilitats dels dos antifúngics, essent l'anidulafungina la que va presentar millor activitat enfront *C. parapsilosis*, especialment pels valors de la CMIB₉₀ (reducció de més de 1.000 vegades el valor de la LAmB, que va mostrar un efecte limitat). Els nostres estudis *in vitro* han demostrat que no hi ha correlació entre la sensibilitat obtinguda a les plaques de poliestirè i en els discos de silicona i que, utilitzant aquests últims, l'antifúngic més eficaç ha estat l'anidulafungina. Per tant, s'ha demostrat la importància del substrat de desenvolupament de les biopel·lícules de *C. parapsilosis* pels estudis de sensibilitat *in vitro*. Els resultats han estat confirmats en el model animal d'infecció de catèter, on també s'ha pogut observar que, per *C. parapsilosis*, l'anidulafungina ha sigut el tractament que ha mostrat més eficàcia en el segellat de catèter. Per tant, segons la experiència observada, s'haurien d'utilitzar discos de silicona per a les proves de sensibilitat *in vitro* dels antifúngics creixent en biopel·lícules, ja que és el mateix substrat que el dels catèters mèdics. Tot i

que els autors que reporten estudis *in vitro* de sensibilitat de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules, ja sigui sobre superfícies de silicona (144,147,194) o de poliuretà (196,205), donen suport a l'ús de les equinocandines o de la dAmB, respecte els azols, per a tractar aquest tipus d'infeccions, a la literatura no existeixen estudis comparadors avaluant el comportament dels antifúngics enfront a *Candida* spp. quan creixen formant les biopel·lícules sobre els diferents substrats. És el primer cop que es compara l'actuació dels antifúngics enfront les biopel·lícules desenvolupades sobre superfícies de poliestirè (tècniques convencionals) *versus* el mateix substrat clínic (silicona mèdica-catèter vascular) enfront una espècie de *Candida* spp., en concret *C. parapsilosis*. Per tant, s'ha de tenir molt present el substrat on es formen els *biofilms* microbians, ja que el material influeix molt en el desenvolupament i la sensibilitat d'aquests microorganismes quan creixen formant biopel·lícules. En els altres treballs que componen aquesta Tesi Doctoral, directament s'han realitzat els models de sensibilitat *in vitro* sobre aquests substrats de silicona i, en tots ells es veu una bona correlació dels resultats *in vitro* de la sensibilitat de *C. albicans*, *C. glabrata* o *S. epidermidis* creixent en biopel·lícules sobre els substrats de silicona i l'eficàcia antimicrobiana en el model experimental en conill d'infecció de catèter.

Els resultats obtinguts es poden explicar a partir d'estudis on s'avalua la importància del substrat d'adhesió on creixen *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* formant *biofilms* (59,72,281). En aquests treballs, es remarca la importància del substrat d'adhesió del microorganisme per tal de desenvolupar models fisiològicament més representatius de formació i de la sensibilitat d'aquests microorganismes productors de biopel·lícules. Concretament, Chandra *et al.* (59) van demostrar que les biopel·lícules de *C. albicans* creixent sobre substrats com polimetilmetacrilat (superfícies irregulars), presentaven diferències estructurals a les biopel·lícules desenvolupades sobre discos de silicona (59) o de polivinil (282) (superfícies planes i hidròfobes), descrivint que en aquestes superfícies de silicona, es creaven biopel·lícules amb una estructura bifàsica

diferent, composta per una capa de blastopores recobertes d'elements hifals més dispersos (59). Aquests autors comenten que les propietats fisicoquímiques de les superfícies poden ser les responsables de les diferents condicions ambientals que existeixen dins la biopel·lícula, com les diferències en el pH, la disponibilitat d'oxigen o el potencial redox (283). En el nostre cas, les diferències entre les sensibilitats als diferents antifúngics sobre els diferents substrats estudiats podrien explicar-se clarament per aquest motiu (59,71,283). Tanmateix, està ben estudiat que la naturalesa química del material del catèter en el que els microorganismes s'adhereixen i desenvolupen el *biofilm* també pot jugar un paper molt important en relació a la sensibilitat, ja que s'ha vist que la resistència dels antifúngics també pot sorgir com a conseqüència d'una expressió genètica molt específica i induïda per la superfície on s'hi adhereixen (66,284). Concretament, Baillie *et al.* (66) van descriure que la sensibilitat d'AmB variava en una soca de *C. albicans* creixent en biopel·lícula sobre dos catèters de polivinil de fabricants diferents, remarcant que el diferent contingut o composició del plastificant pot generar *C. albicans* amb diferents sensibilitats a la AmB.

Així doncs, les propietats de la superfície influeixen en diferents etapes de la formació dels *biofilms* de *Candida* spp., fet que pot afectar de diferents maneres la seva sensibilitat als antifúngics quan estan creixent en biopel·lícules, ja sigui per les propietats fisicoquímiques del substrat, per de la densitat cel·lular que es desenvolupa segons el biomaterial o per les alteracions en el seu metabolisme. Els resultats obtinguts en el primer treball remarquen la influència dels substrats on creix *C. parapsilosis* sobre la sensibilitat de l'anidulafungina i l'amfotericina B liposomal quan estan creixent en *biofilms*. D'altra banda, han corroborat la idoneïtat de l'ús de discos de silicona com a substrat de formació de les biopel·lícules pels models de sensibilitat *in vitro*. Tanmateix, han confirmat la seva aplicabilitat com a possible tècnica prèvia al model animal per avaluar possibles tractaments per a la infecció relacionada amb el catèter ja que, al

utilitzar el mateix material que a la pràctica clínica, mimetitzen millor els resultats del comportament de les infeccions sobre aquests dispositius mèdics.

En els darrers anys, l'interès per desenvolupar nous mètodes estandarditzats, senzills i dissenyats per a determinar la sensibilitat antimicrobiana dels microorganismes creixent en biopel·lícules ha anat en augment. L'actual problema en què es troben els microbiòlegs a la pràctica clínica és que no es correlacionen els resultats determinats mitjançant les tècniques convencionals dels microorganismes creixent de forma planctònica o en biopel·lícules, que poden presentar una resistència als antimicrobians fins a 1.000 vegades superior (59,92–94). Referent als resultats del primer i segon treballs, el primer objectiu que es volia assolir era determinar la sensibilitat *in vitro* de la LAmB i l'anidulafungina enfront diferents espècies de *Candida* creixent en discos de silicona. Aquests han corroborat, un cop més, aquest fet en que les CMI de *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. parapsilosis* creixent en planctònic no són una bona mesura de l'activitat antifúngica d'aquests antimicrobians quan les espècies estudiades creixen formant *biofilms*, i que les concentracions dels fàrmacs necessàries per inhibir i eradicar els microorganismes dels *biofilms*, són molt més elevades que les que es requereixen pels cultius planctònics.

Els nostres resultats *in vitro* de sensibilitat de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules, mostren que les soques de *C. albicans*, van presentar una eficàcia similar tant per la LAmB com per l'anidulafungina en canvi, per les soques d'altres espècies diferents a *Candida albicans* (*C. parapsilosis* i *C. glabrata*) l'anidulafungina va ser el tractament anti-*biofilm* més eficaç. La dAmB i les equinocandines, com la caspofungina o la micafungina han demostrat eficàcia davant soques de *Candida* spp. creixent en biopel·lícules (198). Tot i així, l'eficàcia de l'anidulafungina i de les formulacions lipídiques d'AmB enfront *Candida* spp. creixent en *biofilms* estan poc estudiades (119). Öncü *et al.* (197) van provar l'efecte de dAmB comparat amb el de la caspofungina davant de soques de *C.*

albicans i *C. parapsilosis* creixent en segments de silicona i van observar una completa eradicació d'aquests microorganismes. Ramage *et al.* (204) i Kawai *et al.* (201), van demostrar una activitat depenent de la dosi de la LAmB enfront *C. albicans* i *C. glabrata* creixent en biopel·lícules, similars als resultats obtinguts en els estudis d'aquesta Tesi Doctoral. També en acord amb els nostres resultats, Cateau *et al.* (144) reporten resultats satisfactoris de les equinocandines (caspofungina i micafungina) enfront *C. albicans* i *C. glabrata* productores de *biofilms* joves i madurs al fer-les créixer sobre substrats de silicona. Toulet *et al.* (194) van mostrar que, tot i que LAmB a concentracions de 1.000 mg/L presentava una ràpida i persistent activitat inhibidòria, no eradicava completament *C. albicans*, *C. glabrata* ni *C. parapsilosis* en l'estat de *biofilm* madur essent *C. parapsilosis* la menys sensible de totes. Aquests resultats també serien similars als obtinguts en aquesta Tesi Doctoral. En els nostres resultats, el comportament de l'amfotericina B liposomal en *C. parapsilosis* i *C. glabrata* no era el que esperàvem. Tanmateix, ens va cridar l'atenció la gran eficàcia, tan *in vitro* com *in vivo*, de l'anidulafungina davant d'aquestes dues soques creixent en biopel·lícules. No existeixen estudis que reportin els resultats similars als presentats en la present Tesi Doctoral.

Tot i que s'han estudiat amb detall els mecanismes de resistència de les biopel·lícules de *C. albicans* productors biopel·lícules per la AmB, aquests no han sigut avaluats per a les seves formulacions liposomals (145). El contingut d'ergosterol de les cèl·lules dels llevats a les últimes etapes de creixement de la biopel·lícula es redueix. Tanmateix, quan assoleixen la maduresa depenen, en menor mesura, de l'ergosterol per a mantenir la fluïdesa de la membrana. Aquest efecte limita potencialment l'eficàcia dels fàrmacs en que la seva diana terapèutica és l'ergosterol, com l'AmB (120). La MEC ajuda a preservar la integritat de l'arquitectura de les biopel·lícules de *Candida* spp. i contribueix a la resistència d'aquestes enfront els antifúngics. S'ha demostrat que el (1,3)- β -D-glucà, principal component estructural de la paret cel·lular fúngica (145) segresta l'AmB i, per tant, limita la seva difusió a l'interior dels microorganismes del *biofilm* (131,132).

Finalment, LaFleur *et al.* (112), van demostrar l'existència de cèl·lules persistents de *C. albicans* tractades amb l'AmB. Així doncs, l'ús de les formulacions lipídiques (LAmB), especialment a dosis altes (5 mg/mL), podria reduir potencialment aquests mecanismes de resistència de l'AmB en els *biofilms* de *Candida* spp. Vandeputte *et al.* (285) van revelar que la membrana de *C. glabrata* té un contingut més baix d'ergosterol que la de *C. albicans*, ja que presenta una mutació en el gen ERG6 que condiciona aquesta disminució. Aquestes diferències relacionades amb l'ergosterol, podrien explicar el perquè la LAmB va mostrar una eficàcia reduïda en el nostre model d'infecció relacionada amb el catèter produïda per *C. glabrata*.

En els nostres resultats de viabilitat cel·lular visualitzat amb el CLSM, vam poder observar que, com en el grup control, la morfologia de les soques estudiades de *C. parapsilosis*, *C. albicans* i *C. glabrata* tractades amb la LAmB, presentaven cèl·lules petites i ovoides. Per contra, quan *C. albicans* i *C. parapsilosis* es van exposar a baixes concentracions d'anidulafungina, aquestes mostraven una morfologia cel·lular deformada, presentant una estructura gran i globosa, suggerint un defecte estructural a la superfície cel·lular. Aquest efecte podria estar relacionat amb el mecanisme d'acció de les equinocandines que, com s'ha comentat, inhibeixen la (1,3)- β -D-glucà sintasa, responsable de la biosíntesi del (1,3)- β -D-glucà (145). Tanmateix, tot i mostrar eficàcia igualment, aquesta morfologia globosa i deformada no es presentava ni en *C. glabrata* ni quan *C. albicans* o *C. parapsilosis* s'exposaven a concentracions altes d'anidulafungina. L'explicació per aquest fet no ha estat encara descrita.

En els estudis *in vivo* realitzats amb *Candida* spp., s'ha avaluat l'eficàcia de l'*antifungal lock* de l'anidulafungina *versus* la LAmB en un model experimental en conill d'infecció de catèter per *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. En el model d'infecció de catèter per *C. parapsilosis* i *C. glabrata*, l'anidulafungina com a ALT va resultar ser més eficaç que la LAmB en eradicar la colonització dels catèters a les 48 hores del tractament. En

canvi, en la infecció per *C. albicans*, no hi van haver diferències significatives en l'eficàcia entre els dos antifúngics.

S'han reportat diferents estudis d'ALT en un models d'infecció experimental per *C. albicans*, tanmateix, no hi ha evidències de l'ús d'anidulafungina per ALT en models animals d'infecció relacionada al catèter per altres espècies de *Candida*, com *C. glabrata* o *C. parapsilosis*. En els estudis de *C. albicans*, Mukherjee *et al.* (207), van aconseguir esterilitzar els catèters després d'11 dies d'ALT amb el complex lipídic d'AmB (ABLC). En un altre estudi que utilitzava el mateix model, es va estudiar l'eficàcia de la LAmB i el fluconazol com a ALT enfront *C. albicans*, després d'un tractament de 8 hores/dia durant 7 dies, es va obtenir una eradicació en tots els catèters tractats amb la LAmB (7 de 7), comparat amb només 2 dels 7 tractats amb el fluconazol (203). En un model d'infecció de catèter en ratolí, Shuford *et al.* (206), van demostrar l'esterilització dels catèters infectats per *C. albicans* després de 7 dies de tractament d'ALT amb la dAmB o la caspofungina, i es van obtenir resultats de negativització dels cultius de 16/16 amb la caspofungina i 13/16 amb la dAmB. En un altre estudi en ratolins en que s'avaluava l'eficàcia de la caspofungina enfront *C. albicans*, també es va observar una eradicació dels microorganismes dels catèters en el 66,7% dels casos (215). Així doncs, els nostres resultats de *C. albicans* són similars als descrits a la literatura i suggereixen que les formulacions lipídiques d'amfotericina B o les equinocandines podrien ser tractaments eficaços per a poder utilitzar en la tècnica de l'*antifungal lock*.

La informació publicada sobre el maneig conservador de la infecció relacionada amb els catèters per *Candida* spp. en humans utilitzant la tècnica de l'*antifungal lock*, és escassa i, tot i que les guies terapèutiques (13,37) recomanen la retirada del catèter, aquesta opció no sempre s'adapta a les necessitats dels pacients, ja que en alguns casos aquesta no és possible, ja sigui per la dificultat d'inserció o pel cost i/o les males condicions dels pacient, determinant que la seva retirada sigui altament indesitjable. Un

tractament conservador ràpid i eficaç per a tractar-les seria clínicament rellevants ja que permetrien l'accés segur als LTCVC en aquest subgrup de pacients. Recentment, Imbert *et al.* (198), han publicat una revisió dels diferents tractaments utilitzats com a ALT i han inclòs tots els estudis clínics que hi ha sobre *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. Hem de considerar que és difícil posar en conjunt tota la informació ja que hi ha gran diversitat de malalties de base i també es recullen casos individuals. Pel que fa referència als casos relacionats amb *C. albicans*, en 5 de 5 pacients tractats amb ALT utilitzant la dAmB a dosi de 2 – 2.5 mg/mL, es va demostrar la curació el catèter (208,209,286). D'altra banda, Buckler *et al.* (287), van reportar una taxa de recuperació del catèter del 50% (1 de 2 casos) utilitzant una teràpia de segellat amb la formulació liposomal d'AmB a 2,67 mg/mL. S'han descrit quatre casos d'infecció de catèter per *C. glabrata* utilitzant la dAmB (209,211) en que només 1 de 3 casos va aconseguir recuperar el catèter quan la concentració era de 2,5 mg/mL, mentres que un sol pacient tractat amb altes concentracions de la dAmB (5 mg/mL) va ser capaç d'aconseguir la completa eradicació dels microorganismes del catèter. No hi ha cap cohort ben definida amb taxes de fracàs o èxit amb dAmB com a ALT. Només hi ha tres episodis d'infecció per *C. glabrata* utilitzant la LAmB a 2,67 mg/mL, i en dos es va aconseguir recuperar el catèter (287). Seria interessant considerar utilitzar concentracions de 5 mg/mL de la LAmB en pacients, ja que al ser un fàrmac amb una activitat depenent de la dosi, faria pensar que si s'utilitzessin aquestes concentracions, els resultats serien més prometedors que els obtinguts fins al moment. Actualment, en els tres casos reportats amb l'AmB (tant deoxicolat com liposomal) per a tractar infeccions produïdes per *C. parapsilosis*, hi ha hagut un èxit de negativització dels cultius dels catèters del 100% (210,212,287). Els dos únics articles publicats sobre l'ús d'*antifungal lock technique* amb equinocandines enfront *Candida* spp., han descrit l'eficàcia de la caspofungina enfront infecció de catèter per *C. lipolytica* (185) i *C. parapsilosis* (186), utilitzant aquest tractament durant 14 dies. En el primer cas es va poder resoldre la infecció i en canvi, en el segon cas, els hemocultius seguien essent positius malgrat el tractament.

Tanmateix, és interessant remarcar que la literatura no hi ha publicacions sobre l'ús en pacients d'anidulafungina per a tractar les infeccions de catèter ocasionades per *Candida* spp.

Com a conclusió dels treballs de *Candida* spp., per una banda, s'ha demostrat que utilitzant silicona com a substrat de formació de la biopel·lícula, es poden mimetitzar millor els resultats de la sensibilitat *in vitro* de les infeccions relacionades amb els catèters vasculars i, per tant, s'ha confirmat la seva idoneïtat com a possible tècnica prèvia al model animal per avaluar l'eficàcia dels tractaments *in vitro* d'aquest tipus d'infeccions. D'altra banda, utilitzant la tècnica de l'*antifungal lock*, tant l'anidulafungina com la LAmB van ser eficaces pel tractament de les infeccions de *C. albicans*, en canvi, per a les soques de *C. glabrata* i *C. parapsilosis*, només l'anidulafungina va proporcionar una disminució ràpida (en només 48 hores) de la colonització del catèter en el model experimental de conill. Els resultats d'aquests estudis, donen suport a l'ús de l'*antifungal lock technique* com a tractament coadjuvant pels casos seleccionats de pacients que tenen una BRCVC no complicada i la retirada del dispositiu no és possible.

Discussió de l'estudi de *S. epidermidis*

Un dels objectius del tercer treball es va centrar en avaluar la sensibilitat *in vitro* de la daptomicina i la vancomicina enfront soques de *S. epidermidis* productores de biopel·lícules creixent en discos de silicona, arribant a demostrar-se que la daptomicina utilitzada a una concentració elevada (50 mg/mL) fou el tractament que va presentar una major eficàcia en l'eradicació de les soques de l'interior de la llum dels catèters. En aquest aspecte, són nombrosos els estudis que han demostrat una ràpida i eficaç activitat bactericida, tant *in vitro* com *in vivo*, de la daptomicina davant diferents soques estafilocòciques (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* i *S. capitis*), independentment de la quantitat de biopel·lícula produïda (18,5% de les soques amb una producció dèbil, 53,8% moderada i 27,7% forta) (288). Tanmateix, s'ha demostrat

que la daptomicina penetra dins dels *biofilms* d'una manera depenent de la concentració (239). Contràriament, la vancomicina, antibiòtic amb una acció depenent del temps d'exposició al fàrmac, ha demostrat tenir una activitat anti-*biofilm* controvertida (220,221,289). L'enorme variació de l'activitat de cada fàrmac quan aquest és avaluat sobre microorganismes productors de *biofilms* respecte els cultius planctònics, apunta a un impacte important sobre la composició de la MEC, tanmateix, no és sorprenent que l'activitat dels diferents antibiòtics no es vegi afectada de la mateixa manera davant d'una soca específica, ja que les interaccions del fàrmac amb els constituents de la matriu (a través dels enllaços d'hidrogen, hidrofòbics, electrostàtics o de van de Waals) (70) depenen, en la gran majoria, de la seva estructura química. En aquest aspecte, s'ha demostrat que els àcids grassos C₁₀ (que formen part de la daptomicina), són claus per a la seva eficàcia, ja que permeten l'entrada d'aquest antibiòtic dins dels *biofilms* madurs (158,159). Contràriament a la daptomicina, s'ha demostrat que la vancomicina es difon lentament a les capes més profundes dels *biofilms*, presentant una sensibilitat disminuïda a aquest fàrmac causada per la seva exposició limitada (220–222,289). Els nostres estudis mostren resultats similars als de la literatura: la sensibilitat de *S. epidermidis* creixent en discos de silicona i tractada amb daptomicina, mesurada a través de les CMEBs, és molt superior a la de la vancomicina.

Els estudis de viabilitat cel·lular presentats en aquesta Tesi Doctoral i determinats amb el microscopi confocal, han confirmat que, després de 24 hores de tractament amb daptomicina a concentració alta (50 mg/mL), la mortalitat de *S. epidermidis* creixent formant *biofilms* va ser superior al 90%. Per contra, la daptomicina a dosi inferior (5 mg/mL) o la vancomicina (10 mg/mL) no van assolir aquest nivell d'eficàcia.

El concepte de les diferències entre les sensibilitats antimicrobianes segons el substrat de formació de les biopel·lícules també s'ha descrit en *S. epidermidis*, *S. aureus* i *Escherichia coli* i aquest s'ha associat en major grau a la densitat cel·lular dels *biofilms*

produïts segons el biomaterial d'adhesió dels microorganismes (290–293). Gomes *et al.* (294) van estudiar l'adhesió, el desenvolupament i la sensibilitat antibiòtica d'*E. coli* creixent en biopel·lícules sobre diferents substrats (silicona, acer inoxidable, polivinil i vidre) i van poder demostrar que la silicona era el material amb major percentatge d'adhesió de les cèl·lules i que els *biofilms* formats sobre aquesta superfície eren menys sensibles als antibiòtics. El seu raonament d'aquest fet va ser que l'alta densitat dels bacteris crea un gradient de concentració (nutrients, oxigen o antibiòtics) que dificulta la seva penetració dins del *biofilm*. D'altra banda, Arciola *et al.* (295) van demostrar que, segons el material del substrat, les soques de *S. epidermidis* tenien més o menys afinitat per adherir-s'hi, fet que es veia afectat en la resistència als antibiòtics pel mateix concepte de la densitat cel·lular, alteracions en el metabolisme dels bacteris o canvis de l'estat fisiològic d'aquests.

Els resultats obtinguts en els estudis *in vivo*, van mostrar a les 24 hores de tractament, tant una reducció dels cultius quantitius com del percentatge de negativització dels cultius quantitius dels catèters, al utilitzar la daptomicina a dosi de 50 mg/mL com a ALT. Aquesta pauta van ser significativament més eficaç ($p \leq 0,001$) que les altres pautes estudiades enfront *S. epidermidis*. En el present estudi, l'utilització d'una concentració alta de daptomicina (50 mg/mL), en comparació amb la baixa (5 mg/mL), va permetre eradicar *S. epidermidis* després d'una sola instil·lació d'ALT i en un mínim de 24 hores, suggerint que aquest antimicrobià penetra ràpidament d'una manera dosi-dependent a les capes més profundes del *biofilm* i la seva activitat la realitza en funció de la concentració assolida a aquest nivell. Els resultats dels nostres experiments són lleugerament similars als de Van Praagh *et al.* (232) en un model de rata, tot i que hi ha algunes diferències en les variables experimentals, els seus resultats l'ALT amb combinació amb tractament sistèmic, van eradicar la infecció de *S. epidermidis* després de dos tractaments diaris d'ALT de 30 minuts amb daptomicina 5 mg/mL. Segons el nostre coneixement, no hi ha més treballs publicats sobre l'eficàcia de la daptomicina

com a ALT en models experimentals d'infecció de catèter enfront *S. epidermidis*, tanmateix, en un altre treball realitzat pel nostre grup, també vam poder demostrar que la daptomicina a alta concentració (50 mg/mL) era capaç d'eradicar altres espècies d'estafilococs com *S. aureus* (229). Així doncs, els resultats apunten que daptomicina a alta concentració podria ser un fàrmac prometedor pel tractament de la infecció de catèter causada per ECN d'estafilococs.

L'ús clínic de la daptomicina com a ALT pel tractament de les infeccions relacionades amb els LTCVC causades per ECN d'estafilococs és escàs. Un estudi va reportar 15 pacients tractats amb ALT a dosi de 5 mg/mL de daptomicina conjuntament amb 14 dies de tractament sistèmic, essent el percentatge de fracàs terapèutic del 25% (219). Per tant, els resultats dels pocs casos clínics reportats en els que s'ha utilitzat la daptomicina 5 mg/mL com a ALT són similars als de la vancomicina, amb un fracàs aproximat del 20%. Els nostres resultats *in vivo* mostren que la daptomicina a 5 mg/mL és més eficaç que la vancomicina 10 mg/mL. Tot i això, amb la dosi alta de la daptomicina (50 mg/mL) es varen obtenir resultats de l'eficàcia significatius, respecte a la vancomicina 10 mg/mL o a la daptomicina 5 mg/mL, en només 24 hores de tractament. Tanmateix, la daptomicina a dosi de 5 mg/mL va obtenir una eficàcia terapèutica però va necessitar més temps (72 hores) per a assolir-la. Aquesta diferència podria traduir-se a una eficàcia superior a la pràctica clínica utilitzant la daptomicina a concentració alta (50 mg/mL), reduint la durada del tractament o prevenint l'aparició de cèl·lules persistents. Aquest fet seria encara més rellevant en pacients sense cap altre accés vascular alternatiu, amb diàtesis hemorràgiques significatives o en pacients pediàtrics.

Com a conclusió del treball de *S. epidermidis*, hem demostrat que la daptomicina a concentració alta (50 mg/mL) va assolir l'objectiu de la negativització dels cultius dels catèters en només 24 hores de tractament en un model experimental d'infecció de catèter en conill.

Les diferències obtingudes en els nostres resultats *in vitro* segons les tècniques utilitzades (mitjançant cultius quantitius o a través de l'estudi de la viabilitat utilitzant la microscopia) poden indicar que hi ha cèl·lules no cultivables (VBNC de l'anglès *viable but non-culturable cells*) però metabòlicament actives. Segons el nostre coneixement, aquest fet ha sigut descrit per Salma *et al.* (296), en *Saccharomyces cerevisiae* i per Zandri G *et al.* (297), en *S. epidermidis*, demostrant que el 77% de les mostres (N = 30) presentaven cèl·lules en l'estat VBNC i, que aquestes, estaven associades significativament ($p < 0.01$) amb CVCs de pacients febrils, suggerint que els microorganismes creixent en *biofilms* associats a CVCs podrien ser un reservori per l'estat de VBNC. Aquest concepte de VBNC ha sigut descrit en bacteris però no en llevats i, el nostre tercer treball, podria ser el primer en descriure aquest estat de VBNC en *Candida* spp. Aquest fet de VBNC és una condició de latència transitòria, en que les cèl·lules estan vives i mantenen un grau d'activitat metabòlica però presenten manca de creixement dels microorganismes en els medis de cultiu (297). Està causat per l'adaptació de les bactèries a l'estrès ambiental, com pot ser l'exposició al fàrmac, i és una condició reversible mitjançant una estimulació adequada. És molt rellevant aquest estat cel·lular de VBNC capaç de recuperar el creixement i virulència, ja que podria estar molt relacionat amb les recurrències d'aquest tipus d'infeccions associades a biomaterials.

Les mínimes diferències observades entre els nostres resultats *in vitro* i els obtinguts en el model animal remarquen la importància de l'ús dels models experimentals. La complexitat de l'entorn que envolta els catèters intravasculars dificulta la duplicació precisa de les condicions *in vivo* en els models *in vitro*. Per exemple, tot i que en els experiments *in vivo* s'afegeixi un model dinàmic del medi, les característiques del flux de circulació sanguínia de l'hoste no poden mimetitzar-se satisfactòriament. A part d'això, també és molt complicat incloure totes les proteïnes de l'hoste i els components immunitaris en aquests models *in vitro*. Per tant, ni tan sols la tecnologia més sofisticada

podria imitar les complicades interaccions entre les cèl·lules, teixits i òrgans que succeeixen en el pacient durant una infecció relacionada amb el catèter.

La principal limitació dels estudis experimentals d'infecció relacionada amb els catèters és la impossibilitat de mantenir l'ALT durant 14 dies (com succeeix en humans). Per aquesta raó, utilitzem un model animal de 24 - 72 hores, en que ens permet veure l'eficàcia del tractament i l'eradicació del *biofilm*. Tanmateix, l'ús de l'ALT ha sigut un important pas endavant per l'eradicació dels microorganismes creixent en *biofilms* i desenvolupats dins de la llum dels catèters intravenosos en aquells pacients hemodinàmicament estables i que no presentaven complicacions. Actualment, els règims d'ALT duren 14 dies, fet que redueix l'accés al dispositiu durant aquest període de temps. Com s'ha comentat, existeixen casos clínics de pacients en que la retirada del LTCVC és difícil i que aquests necessiten urgentment un accés vascular disponible que, a més a més, es beneficiarien d'un període de tractament més curt. Així doncs, trobar un tractament d'ALT més ràpid i eficaç, podria millorar la salut d'aquests pacients permetent un ús més ràpid del catèter vascular, així com reduir l'estància hospitalària i el cost econòmic associat. Considerem que els resultats dels nostres estudis poden aportar informació sobre aquestes estratègies de tractament ràpid i eficaç que es podrien utilitzar, ja que en els nostres models ja hem obtingut tractaments amb un percentatge de negativització dels catèters significatius respecte els altres grups de tractament amb només 24 i 48 hores d'ALT.

VIII. CONCLUSIONS

VIII. CONCLUSIONS

- És important la **selecció del substrat** per establir un model pecís d'estudi *in vitro* de la sensibilitat dels microorganismes creixent en biopel·lícules. En l'àmbit de la infecció relacionada amb els catèters vasculars, es recomana l'ús de silicona com a substrat de formació del *biofilm* ja que, al ser el mateix material utilitzat en la pràctica clínica, mimetitza millor el seu comportament.
- La tècnica de l'*antifungal lock* pel tractament de les infeccions produïdes per *Candida* és dependent de l'espècie.
- Tant l'amfotericina B liposomal com l'anidulafungina són antifúngics prometedors per a l'*antifungal lock technique*, en les infeccions relacionades amb els catèters vasculars de llarga durada causades per ***C. albicans***.
- L'anidulafungina és el tractament més eficaç per l'*antifungal lock technique* per la terapèutica de les infeccions per espècies diferents a *C. albicans* (***C. parapsilosis*** i ***C. glabrata***).
- La daptomicina administrada a una concentració elevada (50 mg/mL) és el tractament més eficaç per l'*antibiotic lock technique* en les infeccions de catèter de llarga durada causades per ECN d'estafilococs, i més concretament per ***S. epidermidis***.
- Els resultats d'aquests treballs donen suport a l'ús de la tècnica d'*antimicrobial lock*, com a tractament coadjuvant a la teràpia sistèmica, en casos seleccionats de pacients amb infeccions relacionades amb els catèters vasculars de llarga durada ocasionades per *Candida* spp. o per *S. epidermidis*.

IX. LÍNIES DE FUTUR

IX. LÍNIES DE FUTUR

En base als resultats obtinguts en els treballs que componen la present Tesi Doctoral, s'ha arribat a la conclusió que existeixen tractaments més ràpids i eficaços per utilitzar a la tècnica de l'*antimicrobial lock* que els que s'havien estudiat fins al moment i que l'ús d'aquesta tècnica amb un tractament adequat podria millorar la salut d'aquests pacients, permetent una utilització més ràpida del catèter vascular, així com reduint l'estància hospitalària i el cost econòmic associat. Tot i això, amb els tractaments antimicrobians disponibles hi ha una aparició continua de mecanismes de resistència, aquest fet fa que ens plantejem noves teràpies "antimicrobianes no antibiòtiques" per a trobar una solució eficaç enfront aquestes infeccions de difícil tractament.

Al laboratori, hem començat una nova línia de futur anomenada "FlashShot", basada en l'ús de l'electròlisi (baixa corrent elèctrica (CE) aplicada mitjançant elèctrodes de platí utilitzant una font d'energia) per a generar, de manera *in situ* en el catèter, àcid hipoclorós (HClO), que serviria per a tractar infeccions produïdes per microorganismes multiresistents, o bé, aquelles de difícil tractament associades a la formació de biopel·lícules. L'HClO és considerat una d'aquestes molècules antimicrobianes no antibiòtiques, ja que s'ha demostrat que té una ràpida acció bactericida enfront múltiples infeccions amb un ampli espectre d'actuació (298–301). Tot i que presenta una activitat potencial enfront els microorganismes, no és una molècula citotòxica ni pels humans ni pels animals, ja que és un constituent endògen natural que forma una part important del sistema immune innat (302). Biològicament, és una espècie reactiva de l'oxigen que sintetitzen els propis neutròfils i macròfags per actuar enfront els microorganismes que fagociten (303). S'ha descrit que el seu mecanisme d'acció es basa en la inhibició de la replicació de l'ADN, fet que precedeix a la inhibició de la síntesi de proteïnes i a la consegüent pèrdua de viabilitat (304).

Fins al moment, s'ha realitzat la Prova de Concepte (POC de l'anglès *Proof-of-Concept*) en la que es va poder demostrar que amb diferents corrents elèctriques de baix amperatge i utilitzant sèrum salí al 0,9% com a electròlit, es podia generar HClO *in situ*. En els resultats de la POC es va poder observar una disminució de més de 1×10^6 UFC/mL de diferents soques extremadament resistents als antimicrobians (XDR de l'anglès *extreamly drug-resistant*) de *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* i en soques fúngiques de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* i *Ryzopus oryzae*, després d'aplicar-los-hi 1, 2 o 3 CE de 2 mA o 20 mA durant 5 minuts i amb períodes de 30 minuts entre cada CE (Figura 9).

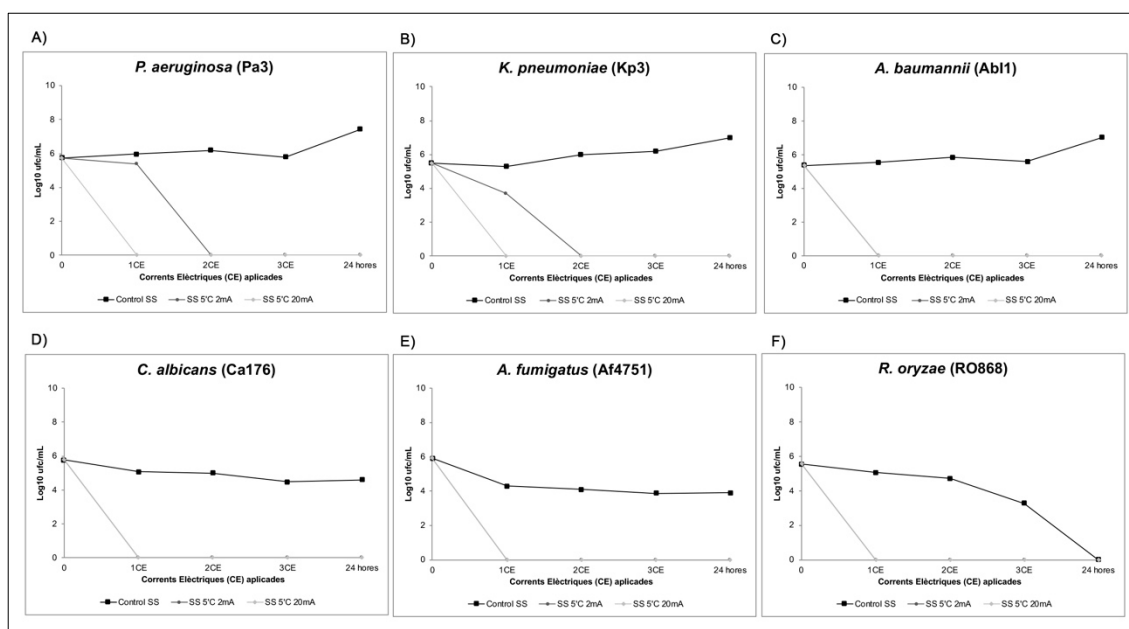


Figura 9. Resultats de la Prova de Concepte FlashShot (2 i 20 mA) enfront diferents microorganismes creixent en planctònic. A) *P. aeruginosa* (Pa3), B) *K. pneumoniae* (Kp3), C) *A. baumannii* (Ab1), D) *C. albicans* (Ca176), E) *A. fumigatus* (Af4751), F) *R. oryzae* (Ro868). CE, corrent elèctrica; SS, sèrum salí; ufc, unitats formadores de colònia; mA, miliampers.

En microorganismes creixent en biopel·lícules sobre superfície de silicó, utilitzant el protocol descrit per Chandra *et al.* (280) i, en el que partíem d'un inòcul de microorganismes de 1×10^7 UFC/mL, aquest efecte fungicida i anti-*biofilm* en soques de

C. albicans, es va observar quan s'aplicava una corrent elèctrica de 2 mA durant 15 minuts. Tanmateix, per diferents soques bacterianes de *S. epidermidis*, *S. aureus* resistent a meticil·lina i *P. aeruginosa*, es va necessitar aplicar una corrent elèctrica de 20 mA durant 15 minuts per obtenir aquest efecte eradicador de la biopel·lícula. A la Figura 10, es mostren els resultats dels discos de silicona visualitzats al microscopi de fluorescència després d'aplicar-los-hi una CE a 2 mA o 20 mA durant 15 minuts.

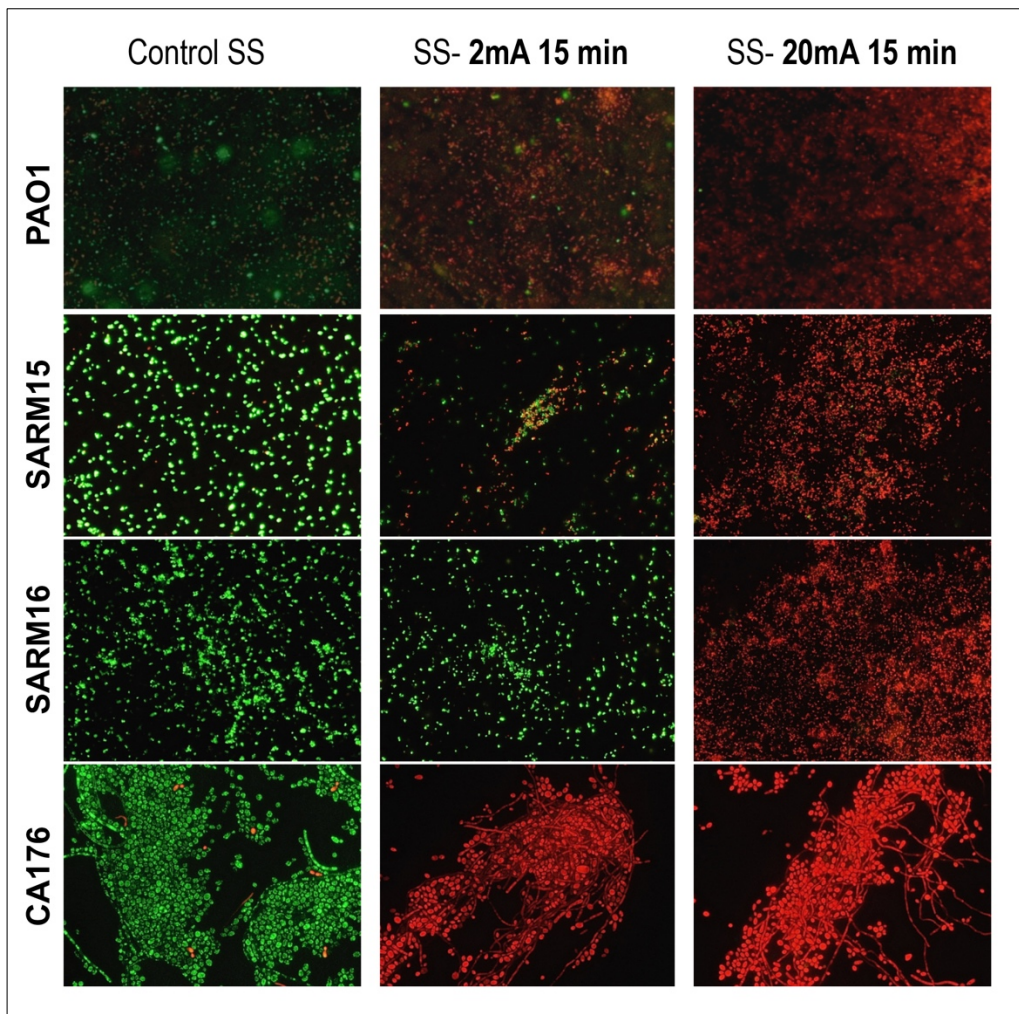


Figura 10. Resultats de la Prova de Concepte FlashShot (2 i 20 mA) enfront diferents microorganismes creixent en biopel·lícules sobre discos de silicona. Visualitzat amb microscòpia de fluorescència amb Live/Dead®. SS, sèrum salí; PA, *P. aeruginosa*; SARM, *S. aureus* resistent a meticil·lina; CA, *C. albicans*; mA, miliampers.

En tot moment, es va mesurar la producció d'HClO generat al medi (utilitzant un mètode espectrofotomètric ASTM 4500-Cl: "DPD Colorimetric Method") i els resultats obtinguts van ser que la mitjana d'[HClO]/mM format en els cultius planctònics va ser de 0,265 i 0,915 al generar una CE durant 5 minuts de 2 mA i 20 mA, respectivament. Tanmateix, la mesura d'aquest mateix paràmetre en el tractament utilitzat pels microorganismes creixent en biopel·lícules, va ser de 0,467 i 2,000 [HClO]/mM durant 15 minuts per 2 mA i 20 mA, respectivament. Aquests darrers resultats han sigut possibles gràcies a la col·laboració establerta amb el Grup d'Investigació d'Enginyeria de la Corrosió i dels Materials Metàlics de l'Institut Químic de Sarrià (Professors J. Avellà i S. Colominas).

Arrel d'aquests resultats tan prometedors, s'ha enviat una patent provisional als Estats Units a data 1/3/2016 anomenada "System, method and uses for "in situ" treatment or prevention of antimicrobial resistant infections or infections difficult to be treated" WO2017149381 (A1)-2017-09-08)16. Inventors: Dr. Gavaldà, Dr. Torrents i Dr. Punes. Institut de Recerca Vall d'Hebron (305). Posteriorment, la sol·licitud de PCT es va presentar a la Oficina Europea de Patents (PCT/IB2017/000193; actualment pendent de resolució).

X. BIBLIOGRAFIA

X. BIBLIOGRAFIA

1. Lebeaux D, Fernández-Hidalgo N, Chauhan A, Lee S, Ghigo J, Almirante B, et al. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis*. 2014 Feb;14(2):146–59.
2. Gallieni M, Pittiruti M, Biffi R. Vascular access in oncology patients. *CA Cancer J Clin*. 2008 Oct 21;58(6):323–46.
3. Umscheid C, Mitchell M, Doshi J, Agarwal R, Williams K, Brennan P. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 Feb 2;32(2):101–14.
4. CDC National and State Healthcare Progress Report [Internet]. 2014. Available from: <http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/progress-report/hai-progress-report.pdf>
5. Bell T, O'Grady N. Prevention of central line–associated bloodstream infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2017 Sep;31(3):551–9.
6. Pronovost P, Needham D, Berenholtz S, Sinopoli D, Chu H, Cosgrove S, et al. An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. *N Engl J Med*. 2006 Dec 28;355(26):2725–32.
7. Dimick J, Pelz R, Consunji R, Swoboda S, Hendrix C, Lipsett P. Increased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit. *Arch Surg*. 2001 Feb;136(2):229–34.
8. Pittet D, Tarara D, Wenzel R. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA*. 1994 May 25;271(20):1598–601.
9. DiGiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the Intensive Care Unit. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Sep;160(3):976–81.
10. Blot S, Depuydt P, Annemans L, Benoit D, Hoste E, De Waele J, et al. Clinical

- and economic outcomes in critically ill patients with nosocomial catheter-related bloodstream infections. *Clin Infect Dis*. 2005 Dec 1;41(11):1591–8.
11. Tacconelli E, Smith G, Hieke K, Lafuma A, Bastide P. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates. *J Hosp Infect*. 2009 Jun;72(2):97–103.
 12. Rello J, Ochagavia A, Sabanes E, Roque M, Mariscal D, Reynaga E, et al. Evaluation of outcome of intravenous catheter-related infections in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3):1027–30.
 13. Mermel L, Allon M, Bouza E, Craven D, Flynn P, O’Grady N, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter- related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Jul;49(1):1–45.
 14. A report from the NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004 Dec;32(8):470–85.
 15. Muñoz P, Bouza E, San Juan R, Voss A, Pascau J, Desco M. Clinical-epidemiological characteristics and outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in Europe (ESGNI-006 Study). *Clin Microbiol Infect*. 2004 Sep;10(9):843–5.
 16. Estudios de Vigilancia de Infección Nosocomial en Unidades de Críticos (ENVIN) [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 28]. Available from: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe ENVIN-UCI 2016.pdf>
 17. Maki D, Kluger D, Crnich C. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin Proc*. 2006 Sep;81(9):1159–71.
 18. Ferrer C, Almirante B. Venous catheter-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Feb;32(2):115–24.

19. Sociedad Española de Medicina Preventiva y Salud Pública. Estudio EPINE: resultados [Internet]. [cited 2018 Apr 27]. Available from: http://hws.vhebron.net/epine/Global/EPINE-EPPS_2017_Informe_Global_de_España_Resumen.pdf
20. Raad I, Hanna H, Maki D. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis*. 2007 Oct;7(10):645–57.
21. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado J, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):O245–54.
22. Puig-Asensio M, Pemán J, Zaragoza R, Garnacho-Montero J, Martín-Mazuelos E, Cuenca-Estrella M, et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med*. 2014 Jun;42(6):1423–32.
23. Almirante B, Limón E, Freixas N, Gudiol F. Laboratory-based surveillance of hospital-acquired catheter-related bloodstream infections in Catalonia. Results of the VINCat Program (2007–2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 Jun;30:13–9.
24. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S, Seifert H, Wenzel R, Edmond M. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004 Aug 1;39(3):309–17.
25. Fernández-Hidalgo N, Almirante B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Jan 26;12(1):117–29.
26. O’Grady N, Alexander M, Burns L, Dellinger E, Garland J, Heard S, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis*. 2011 May 1;52(9):e162–93.
27. Lamoth F, Lockhart S, Berkow E, Calandra T. Changes in the epidemiological

- landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Jan 1;73(suppl_1):i4–13.
28. Montagna M, Lovero G, Borghi E, Amato G, Andreoni S, Campion L, et al. Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(5):661–74.
 29. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb;55(2):532–8.
 30. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jun;20:5–10.
 31. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari M, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis.* 2006 Dec 10;6(1):21.
 32. Cleveland A, Harrison L, Farley M, Hollick R, Stein B, Chiller T, et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of candida resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. Chowdhary A, editor. *PLoS One.* 2015 Mar 30;10(3):e0120452.
 33. Asmundsdottir L, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J Clin Microbiol.* 2013 Mar;51(3):841–8.
 34. Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila V, Koivula I, Lumio J, Kotilainen P, et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004–2007. *BMC Infect Dis.* 2010 Dec 28;10(1):312.
 35. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey G. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis.* 1993

- Aug;168(2):400–7.
36. Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2014 Apr-Jun;4(2):161.
 37. Aldea C, Garcia I, Guembe M, Alarcón J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares 15a. 2018.
 38. Trautner B, Darouiche R. Catheter-associated infections. *Arch Intern Med*. 2004 Apr 26;164(8):842.
 39. Safdar N, Maki D. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters. *Intensive Care Med*. 2004 Jan 1;30(1):62–7.
 40. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect*. 2002 May;8(5):256–64.
 41. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Pérez J, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol*. 1985 Mar;21(3):357–60.
 42. Bouza E. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares. *Procedimientos en microbiología clínica* [Internet]. 2004 [cited 2018 Jul 8]. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia15.pdf>
 43. Crnich C, Maki D. The promise of novel technology for the prevention of intravascular device–related bloodstream infection. I. Pathogenesis and short-term devices. *Clin Infect Dis*. 2002 May;34(9):1232–42.
 44. Kojic E, Darouiche R. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Apr 1;17(2):255–67.
 45. Smuszkiewicz P, Trojanowska I, Tomczak H. Venous catheter microbiological monitoring. Necessity or a habit? *Med Sci Monit*. 2009 Feb;15(2):SC5-8.
 46. Lorente L, Henry C, Martín MM, Jiménez A, Mora ML. Central venous catheter-

- related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. *Crit Care*. 2005 Sep;9(6):R631.
47. Santarpià L, Pasanisi F, Alfonsi L, Violante G, Tiseo D, De Simone G, et al. Prevention and treatment of implanted central venous catheter (CVC) - related sepsis: a report after six years of home parenteral nutrition (HPN). *Clin Nutr*. 2002 Jun;21(3):207–11.
 48. Buchman A, Moukarzel A, Goodson B, Herzog F, Pollack P, Reyen L, et al. Catheter-related infections associated with home parenteral nutrition and predictive factors for the need for catheter removal in their treatment. *J Parenter Enter Nutr*. 1994 Jul 2;18(4):297–302.
 49. Fox E, Nobile C. A sticky situation. *Transcription*. 2012 Nov 18;3(6):315–22.
 50. Pemán J, Cantón E, Valentín A. Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms. *Rev Iberoam Micol*. 2008 Jun;25(2):124–8.
 51. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999 Mar 19;283(5409):1837, 1839.
 52. Ramage G, Saville S, Thomas D, Lopez-Ribot J. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005 Apr 1;4(4):633–8.
 53. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012 Oct;2012:528521.
 54. Costerton J, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. 1994 Apr;176(8):2137–42.
 55. Donlan R, Costerton J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167–93.
 56. Kumamoto C. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Dec;5(6):608–11.
 57. Douglas L. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003 Jan;11(1):30–6.
 58. Lynch A, Robertson G. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008 Feb;59(1):415–28.

59. Chandra J, Kuhn D, Mukherjee P, Hoyer L, McCormick T, Ghannoum M. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001 Sep;183(18):5385–94.
60. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2009 Nov 28;35(4):340–55.
61. Donlan R. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):881–90.
62. Al-Fattani M. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006 Aug 1;55(8):999–1008.
63. Branda S, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):20–6.
64. Al-Fattani M, Douglas L. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep 1;48(9):3291–7.
65. Parahitiyawa N, Samaranayake Y, Samaranayake L, Ye J, Tsang P, Cheung B, et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS.* 2006 Apr;114(4):298–306.
66. Baillie G, Douglas L. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Sep;46(3):397–403.
67. Hawser S, Baillie G, Douglas L. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* 1998 Mar 1;47(3):253–6.
68. Del Pozo J, Cantón E. *Candida* biofilm-related infections. *Rev Iberoam Micol.* 2016 Jul;33(3):176–83.
69. Vroom J, De Grauw K, Gerritsen H, Bradshaw D, Marsh P, Watson G, et al. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Aug;65(8):3502–11.
70. Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Sep

- 2;8(9):623–33.
71. Hawser S, Douglas L. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994 Mar;62(3):915–21.
 72. Kuhn D, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):878–88.
 73. Li X. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2003 Feb 1;149(2):353–62.
 74. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000 May 15;182(10):2675–9.
 75. Blankenship J, Mitchell A. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Dec;9(6):588–94.
 76. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Aug;9(4):340–5.
 77. Gallardo-Moreno A, González-Martín M, Pérez-Giraldo C, Garduño E, Bruque J, Gómez-García A. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Appl Environ Microbiol*. 2002 May;68(5):2610–3.
 78. Masuoka J, Hazen K. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6230–6.
 79. Marshall K, Stout R, Mitchell R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol*. 1971 Nov 1;68(3):337–48.
 80. Miller M, Bassler B. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2001 Oct;55(1):165–99.
 81. Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol*. 2002 Jun;5(3):254–8.
 82. O’Toole G, Kaplan H, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000 Oct;54(1):49–79.

83. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*. 2009 Nov 3;47(7):681–9.
84. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Feb;2(2):114–22.
85. Starkey M, Chang S, Gray K, Parsek M. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. In: *Microbial Biofilms*. American Society of Microbiology; 2004. p. 174–91.
86. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002 Mar;43(6):1367–78.
87. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*. 1996 Jan;178(1):175–83.
88. Uhlinger D, White D. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl Environ Microbiol*. 1983 Jan;45(1):64–70.
89. McCourtie J, Douglas L. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *Microbiology*. 1985 Mar 1;131(3):495–503.
90. Boles B, Horswill A. agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. Cossart P, editor. *PLoS Pathog*. 2008 Apr 25;4(4):e1000052.
91. Chambless J, Hunt S, Stewart P. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Mar 1;72(3):2005–13.
92. Ramage G, Vandewalle K, Wickes B, López-Ribot J. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001 Dec;18(4):163–70.
93. Baillie G, Douglas L. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Aug;42(8):1900–5.

94. Ramage G, Vande Walle K, Wickes B, López-Ribot J. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Sep;45(9):2475–9.
95. Stewart P, McFeters G, Xu K. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*. 2000 Mar 1;146(3):547–9.
96. Mah T, O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001 Jan;9(1):34–9.
97. Silva S, Rodrigues C, Araújo D, Rodrigues M, Henriques M. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *J Fungi*. 2017 Feb 21;3(1):8.
98. Stewart P, Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* (London, England). 2001 Jul 14;358(9276):135–8.
99. Taff H, Mitchell KK, Edward J, Andes D. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013 Oct;8(10):1325–37.
100. Bordi C, de Bentzmann S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Ann Intensive Care*. 2011 Jun;1(1):19.
101. Maunders E, Welch M. Matrix exopolysaccharides: the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Jul 15;364(13).
102. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot J, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*. 2012 Jan;55(1):80–5.
103. Bizerra F, Melo A, Katchburian E, Freymüller E, Straus A, Takahashi H, et al. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan;55(1):302–10.
104. Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Sep;63(5):355–7.
105. Venglarčík J, Blair L, Dunkle L. pH-dependent oxacillin tolerance of

- Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983 Feb;23(2):232–5.
106. Kucharikova S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdakova H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol.* 2011 Sep 1;60(9):1261–9.
107. Stewart P, Franklin M. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Mar;6(3):199–210.
108. Brown M, Allison D, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother.* 1988 Dec;22(6):777–80.
109. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jan 4;5(1):48–56.
110. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010 Oct 13;64(1):357–72.
111. Hall-Stoodley L, Costerton J, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):95–108.
112. LaFleur M, Kumamoto C, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Nov 1;50(11):3839–46.
113. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jul 1;67(7):2982–92.
114. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001 Mar 18;80(3):903–8.
115. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Sep;39(9):2128–31.
116. Ramage G, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab.* 2001 Aug;20(7):42–4.
117. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development.

- Nat Rev Microbiol. 2011 Feb;9(2):109–18.
118. Bachmann SSP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TFT, Wickes BBL, Graybill JJR, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3591–6.
119. Walraven C, Lee S. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):1–8.
120. Mukherjee P, Chandra J, Kuhn D, Ghannoum M. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*. 2003 Aug;71(8):4333–40.
121. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Jun;49(6):973–80.
122. Mukherjee P, Chandra J, Kuhn D, Ghannoum M. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology*. 2003 Jan;149(Pt 1):261–7.
123. Cannon R, Lamping E, Holmes A, Niimi K, Baret P, Keniya M, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr 1;22(2):291–321.
124. Bizerra F, Nakamura C, De Poersch C, Estivalet Svidzinski T, Borsato Quesada R, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008 Jan 31;8(3):442–50.
125. Niimi K, Maki K, Ikeda F, Holmes A, Lamping E, Niimi M, et al. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr 1;50(4):1148–55.
126. Perumal P, Mekala S, Chaffin W. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul 1;51(7):2454–63.

127. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2010 Dec 17;61(6):534–40.
128. Rodrigues C, Silva S, Azeredo J, Henriques M. *Candida glabrata*'s recurrent infections: biofilm formation during amphotericin B treatment. *Lett Appl Microbiol*. 2016 Aug;63(2):77–81.
129. Fonseca E, Silva S, Rodrigues C, Alves C, Azeredo J, Henriques M. Effects of fluconazole on *Candida glabrata* biofilms and its relationship with ABC transporter gene expression. *Biofouling*. 2014 Apr 21;30(4):447–57.
130. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):288–305.
131. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holyda K, Hoff B, et al. Putative role of -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Feb 1;51(2):510–20.
132. Vedyappan G, Rossignol T, D'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May 1;54(5):2096–111.
133. Nett J, Crawford K, Marchillo K, Andes D. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug 1;54(8):3505–8.
134. Mitchell K, Taff H, Cuevas M, Reinicke E, Sanchez H, Andes D. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans* *Candida* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1918–20.
135. Khot P, Suci P, Miller R, Nelson R, Tyler B. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and -1,6-glucan pathway genes. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2006 Nov 1;50(11):3708–16.
136. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008 Feb;322:107–31.
137. Al-Dhaheer R, Douglas L. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May 1;52(5):1884–7.
138. Cornely O, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg B, Lortholary O, et al. Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Dec;18:19–37.
139. Baginski M, Resat H, McCammon J. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Mol Pharmacol.* 1997 Oct;52(4):560–70.
140. Duguid I, Evans E, Brown M, Gilbert P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother.* 1992 Dec;30(6):803–10.
141. Baillie G, Douglas L. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Aug;42(8):2146–9.
142. Dumitru R, Hornby J, Nickerson K. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul 1;48(7):2350–4.
143. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Graninger W, Presterl E. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Feb 1;65(2):271–4.
144. Cateau E, Rodier M, Imbert C. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Apr 1;62(1):153–5.
145. Perlin D. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad*

- Sci. 2015 Sep;1354(1):1–11.
146. Melo A, Colombo A, Arthington-Skaggs B. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep 1;51(9):3081–8.
 147. Cateau E, Berjeaud J, Imbert C. Possible role of azole and echinocandin lock solutions in the control of *Candida* biofilms associated with silicone. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Apr;37(4):380–4.
 148. Stevens D, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep 1;50(9):3160–1.
 149. Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B, Ruhnke M. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Feb 4;27(2):127–31.
 150. John J, Harvin A. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Ther Clin Risk Manag*. 2007 Dec;3(6):1143–52.
 151. Fischer A, Yang S, Bayer A, Vaezzadeh A, Herzig S, Stenz L, et al. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Aug;66(8):1696–711.
 152. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Apr;42(4):939–41.
 153. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob*

- Chemother. 2010 Sep 1;65(9):1955–8.
154. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. *Jpn J Infect Dis*. 2005 Dec;58(6):353–7.
 155. Farber B, Kaplan M, Clogston A. Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis*. 1990 Jan;161(1):37–40.
 156. Alborn W, Allen N, Preston D. Daptomycin disrupts membrane potential in growing Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Nov;35(11):2282–7.
 157. Kanafani Z, Corey G. Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Apr 10;5(2):177–84.
 158. Stewart P, Davison W, Steenbergen J. Daptomycin rapidly penetrates a Staphylococcus epidermidis biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug 1;53(8):3505–7.
 159. Hogan S, Zapotoczna M, Stevens N, Humphreys H, O’Gara J, O’Neill E. In vitro approach for identification of the most effective agents for antimicrobial lock therapy in the treatment of intravascular catheter-related infections caused by Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 May;60(5):2923–31.
 160. Pappas P, Kauffman C, Andes D, Benjamin, Jr. D, Calandra T, Edwards, Jr. J, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar;48(5):503–35.
 161. García-Teresa M, Casado-Flores J, Delgado Domínguez M, Roqueta-Mas J, Cambra-Lasaosa F, Concha-Torre A, et al. Infectious complications of percutaneous central venous catheterization in pediatric patients. *Intensive Care*

- Med. 2007 Feb 26;33(3):466–76.
162. Wilson G, van Noesel M, Hop W, Van de Ven C. The catheter is stuck: complications experienced during removal of a totally implantable venous access device. A single-center study in 200 children. *J Pediatr Surg.* 2006 Oct;41(10):1694–8.
 163. Maizlin I, Carpentier H, Bliss D. Difficult extraction of long-term central venous catheters in children—case report. *J Pediatr Surg.* 2010 Aug;45(8):1720–3.
 164. Milbrandt K, Beaudry P, Anderson R, Jones S, Giacomantonio M, Sigalet D. A multiinstitutional review of central venous line complications: retained intravascular fragments. *J Pediatr Surg.* 2009 May;44(5):972–6.
 165. Bouza E, Alvarado N, Alcalá L, Pérez M, Rincon C, Muñoz P. A randomized and prospective study of 3 procedures for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection without catheter withdrawal. *Clin Infect Dis.* 2007 Mar 15;44(6):820–6.
 166. Timsit J. Diagnosis and prevention of catheter-related infections. *Curr Opin Crit Care.* 2007 Oct;13(5):563–71.
 167. Yildizeli B, Laçın T, Batirel H, Yüksel M. Complications and management of long-term central venous access catheters and ports. *J Vasc Access.* 2004 Oct-Dec;5(4):174–8.
 168. Biffi R, de Braud F, Orsi F, Pozzi S, Mauri S, Goldhirsch A, et al. Totally implantable central venous access ports for long-term chemotherapy. A prospective study analyzing complications and costs of 333 devices with a minimum follow-up of 180 days. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1998 Jul;9(7):767–73.
 169. Anaissie E, Rex J, Uzun O, Vartivarian S. Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia. *Am J Med.* 1998 Mar;104(3):238–45.
 170. Dugdale D, Ramsey P. *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with Hickman catheters. *Am J Med.* 1990 Aug;89(2):137–41.

171. Del Pozo J, Cenoz M, Hernáez S, Martínez A, Serrera A, Aguinaga A, et al. Effectiveness of teicoplanin versus vancomycin lock therapy in the treatment of port-related coagulase-negative staphylococci bacteraemia: a prospective case-series analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Nov;34(5):482–5.
172. Funalleras G, Fernandez-Hidalgo N, Borrego A, Almirante B, Planes A, Rodriguez D, et al. Effectiveness of antibiotic-lock therapy for long-term catheter-related bacteremia due to gram-negative bacilli: a prospective observational study. *Clin Infect Dis*. 2011 Nov 1;53(9):e129–32.
173. Fernandez-Hidalgo N. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr 4;57(6):1172–80.
174. Messing B, Peitra-Cohen S, Debure A, Beliah M, Bernier J. Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter-related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *J Parenter Enter Nutr*. 1988 Mar 2;12(2):185–9.
175. Vanholder R, Canaud B, Fluck R, Jadoul M, Labriola L, Marti-Monros A, et al. Diagnosis, prevention and treatment of haemodialysis catheter-related bloodstream infections (CRBSI): a position statement of European Renal Best Practice (ERBP). *Clin Kidney J*. 2010 Jun 1;3(3):234–46.
176. Randolph A, Cook D, Gonzales C, Andrew M. Benefit of heparin in central venous and pulmonary artery catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chest*. 1998 Jan;113(1):165–71.
177. Lepape A. Is there any microbiologically-based specificity of the management of catheter related infections? *Ann Fr Anesth Reanim*. 2005 Mar;24(3):298–301.
178. Morales-Molina J, Mateu-de Antonio J, Grau S, Segura M, Acosta P. La estabilidad como factor para considerar en las soluciones de sellado antibiótico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Feb;28(2):104–9.
179. Vercaigne L, Sitar D, Penner S, Bernstein K, Wang G, Burczynski F. Antibiotic-heparin lock: in vitro antibiotic stability combined with heparin in a central venous

- catheter. *Pharmacotherapy*. 2000 Apr;20(4):394–9.
180. Lai J, Brodeur S. Physical and chemical compatibility of daptomycin with nine medications. *Ann Pharmacother*. 2004 Oct;38(10):1612–6.
181. Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, Hanna H, Hachem R, Dvorak T, et al. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Nov;47(11):3580–5.
182. Del Pozo J, Rodil R, Aguinaga A, Yuste J, Bustos C, Montero A, et al. Daptomycin lock therapy for grampositive long-term catheter-related bloodstream infections. *Int J Clin Pract*. 2012 Mar;66(3):305–8.
183. Bookstaver P, Rokas K, Norris L, Edwards J, Sherertz R. Stability and compatibility of antimicrobial lock solutions. *Am J Heal Pharm*. 2013 Dec 15;70(24):2185–98.
184. Condie C, Tyler L, Barker B, Canann D. Visual compatibility of caspofungin acetate with commonly used drugs during simulated Y-site delivery. *Am J Heal Pharm*. 2008 Mar 1;65(5):454–7.
185. Özdemir H, Karbuz A, Çiftçi E, Dinçaslan H, İnce E, Aysev D, et al. Successful treatment of central venous catheter infection due to *Candida lipolytica* by caspofungin-lock therapy. *Mycoses*. 2011 Sep;54(5):e647–9.
186. İşgüder R, Ceylan G, Sandal Ö, Sarı F, Gülfidan G, Demirağ B, et al. Reasons for failure of antifungal-lock therapy with caspofungin: need for higher concentrations. *Turkish J Pediatr Emerg Intensive Care Med*. 2017 Apr 5;4(1):30–2.
187. Segarra-Newnham M, Martin-Cooper E. Antibiotic lock technique: a review of the literature. *Ann Pharmacother*. 2005 Feb;39(2):311–8.
188. Rex J, Bennett J, Sugar A, Pappas P, Serody J, Edwards J, et al. Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID mycoses study group and the candidemia study group. *Clin Infect Dis*. 1995 Oct;21(4):994–6.
189. Nucci M, Anaissie E, Betts R, Dupont B, Wu C, Buell D, et al. Early removal of

- central venous catheter in patients with candidemia does not improve outcome: analysis of 842 patients from 2 randomized clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug;51(3):295–303.
190. Rodriguez D, Park B, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Planes A, Mensa J, et al. Impact of early central venous catheter removal on outcome in patients with candidaemia. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Aug;13(8):788–93.
191. McGhee W, Michaels M, Martin J, Mazariegos G, Green M. Antifungal lock therapy with liposomal amphotericin B: a prospective trial. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016 Mar;5(1):80–4.
192. Bachmann S, VandeWalle K, Ramage G, Patterson T, Wickes B, Graybill J, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3591–6.
193. DiMondi P, Townsend M, Johnson M, Durkin M. Antifungal catheter lock therapy for the management of a persistent *Candida albicans* bloodstream infection in an adult receiving hemodialysis. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 2014 Jul;34(7):e120–7.
194. Toulet D, Debarre C, Imbert C. Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? *J Antimicrob Chemother*. 2012 Feb 1;67(2):430–2.
195. Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi E, Posteraro P, Losito A, De Luca A, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. Wormley FL, editor. *PLoS One*. 2012 Mar 30;7(3):e33705.
196. Fiori B, Posteraro B, Torelli R, Tumbarello M, Perlin D, Fadda G, et al. In vitro activities of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):3031–5.
197. Öncü S. In vitro effectiveness of antifungal lock solutions on catheters infected with *Candida* species. *J Infect Chemother*. 2011 Oct;17(5):634–9.

198. Imbert C, Rammaert B. What could be the role of antifungal lock-solutions? From bench to bedside. *Pathogens*. 2018 Jan 6;7(1):6.
199. Lewis R, Kontoyiannis D, Darouiche R, Raad I, Prince R. Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of Candida catheter-related bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3499–505.
200. Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot J. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3591–3.
201. Kawai A, Yamagishi Y, Mikamo H. In vitro efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-albicans *Candida* species biofilms. *J Infect Chemother*. 2015 Sep;21(9):647–53.
202. Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jan;52(1):357–60.
203. Schinabeck M, Long L, Hossain M, Chandra J, Mukherjee P, Mohamed S, et al. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 May;48(5):1727–32.
204. Ramage G, Jose A, Sherry L, Lappin D, Jones B, Williams C. Liposomal amphotericin B displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2369–71.
205. Simitsopoulou M, Kyrpitzis D, Velegaki A, Walsh T, Roilides E. Caspofungin at catheter lock concentrations eradicates mature biofilms of *Candida lusitanae* and *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4953–6.
206. Shuford J, Rouse M, Piper K, Steckelberg J, Patel R. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an

- experimental intravascular catheter infection model. *J Infect Dis.* 2006 Sep;194(5):710–3.
207. Mukherjee P, Long L, Kim H, Ghannoum M. Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Feb;33(2):149–53.
208. Viale P, Petrosillo N, Signorini L, Puoti M, Carosi G. Should lock therapy always be avoided for central venous catheter-associated fungal bloodstream infections? *Clin Infect Dis.* 2001 Dec 1;33(11):1947–8.
209. Benoit J, Carandang G, Sitrin M, Arnow P. Intraluminal antibiotic treatment of central venous catheter infections in patients receiving parenteral nutrition at home. *Clin Infect Dis.* 1995 Nov;21(5):1286–8.
210. Wu C, Lee P. Antibiotic-lock therapy and erythromycin for treatment of catheter-related *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus aureus* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep 1;60(3):706–7.
211. Angel-Moreno A, Boronat M, Bolaños M, Carrillo A, González S, Pérez J. *Candida glabrata* fungemia cured by antibiotic-lock therapy: case report and short review. *J Infect.* 2005 Oct;51(3):e85–7.
212. Castagnola E, Marazzi M, Tacchella A, Giacchino R. Broviac catheter-related candidemia. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Aug;24(8):747.
213. Cocuau C, Rodier M, Daniault G, Imbert C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Sep 1;56(3):507–12.
214. Choi H, Shin J, Jung S, Park K, Cho D, Kee S, et al. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr 1;51(4):1520–3.
215. Lazzell A, Chaturvedi A, Pierce C, Prasad D, Uppuluri P, Lopez-Ribot J. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel

- central venous catheter murine model of candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep 1;64(3):567–70.
216. Raad I, Davis S, Khan A, Tarrand J, Elting L, Bodey G. Impact of central venous catheter removal on the recurrence of catheter-related coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992 Apr;13(4):215–21.
217. Fortun J. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic-lock therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul 19;58(4):816–21.
218. Poole C, Carlton D, Bimbo L, Allon M. Treatment of catheter-related bacteraemia with an antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 May 1;19(5):1237–44.
219. Vassallo M, Genillier P, Dunais B, Kaphan R, Saudes L, Duval Y, et al. Short-course daptomycin lock and systemic therapy for catheter-related bloodstream infections: a retrospective cohort study in cancer patients with surgically implanted devices. *J Chemother.* 2017 Jul 4;29(4):232–7.
220. Abdelhady W, Bayer A, Nast C, Kiedrowski M, Horswill A, Yeaman M, et al. Reduced vancomycin susceptibility in an in vitro catheter-related biofilm model correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Mar;57(3):1447–54.
221. Evans R, Holmes C. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 Jun;31(6):889–94.
222. Mascio C, Alder J, Silverman J. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Dec 1;51(12):4255–60.
223. Domínguez-Herrera J, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Pichardo C, Ruiz-Valderas R, Lepe J, et al. Efficacy of daptomycin versus vancomycin in an

- experimental model of foreign-body and systemic infection caused by biofilm producers and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):613–7.
224. Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 May 1;51(5):1656–60.
225. Aybar Y, Ozaras R, Besirli K, Engin E, Karabulut E, Salihoglu T, et al. Efficacy of tigecycline and vancomycin in experimental catheter-related *Staphylococcus epidermidis* infection: microbiological and electron microscopic analysis of biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Apr;39(4):338–42.
226. Zhang Y, Fu Y, Yu J, Ai Q, Li J, Peng N, et al. Synergy of ambroxol with vancomycin in elimination of catheter-related *Staphylococcus epidermidis* biofilm in vitro and in vivo. *J Infect Chemother*. 2015 Nov;21(11):808–15.
227. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, Mocchegiani F, Silvestri C, et al. Comparative efficacies of quinupristin-dalfopristin, linezolid, vancomycin, and ciprofloxacin in treatment, using the antibiotic-lock technique, of experimental catheter-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct 1;49(10):4042–5.
228. Fernandez-Hidalgo N, Gavalda J, Almirante B, Martin M, Lopez Onrubia P, Gomis X, et al. Evaluation of linezolid, vancomycin, gentamicin and ciprofloxacin in a rabbit model of antibiotic-lock technique for *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Mar 1;65(3):525–30.
229. Meije Y, Almirante B, Del Pozo J, Martín M, Fernández-Hidalgo N, Shan A, et al. Daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a model of *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Infect*. 2014 Jun;68(6):548–52.
230. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer J, Moellering R, Craig W, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adults summary of consensus

- recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2009 Nov;29(11):1275–9.
231. Kim E, Saunders P, Yousefzadeh N. Usefulness of anti-infective lock solutions for catheter-related bloodstream infections. *Mt Sinai J Med A J Transl Pers Med*. 2010 Sep;77(5):549–58.
232. Van Praagh A, Li T, Zhang S, Arya A, Chen L, Zhang X, et al. Daptomycin antibiotic lock therapy in a rat model of Staphylococcal central venous catheter biofilm infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4081–9.
233. Fuchs P, Barry A, Brown S. In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Mar;49(3):467–70.
234. Stuart J, John M, Milburn S, Diagre D, Wilson B, Hussain Z. Susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci to several newer antimicrobial agents in comparison with vancomycin and oxacillin. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Mar;37(3):248–52.
235. Tally F, Zeckel M, Wasilewski M, Carini C, Berman C, Drusano G, et al. Daptomycin: a novel agent for gram-positive infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999 Aug 23;8(8):1223–38.
236. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr Microbiol*. 2011 Sep 15;63(3):313–7.
237. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson K, Pier G, Oliveira R, et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Aug 1;56(2):331–6.
238. Tatarelli P, Parisini A, Del Bono V, Mikulska M, Viscoli C. Efficacy of daptomycin lock therapy in the treatment of bloodstream infections related to long-term catheter. *Infection*. 2015 Feb 12;43(1):107–9.

239. Roveta S, Marchese A, Schito G. Activity of daptomycin on biofilms produced on a plastic support by *Staphylococcus* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Apr;31(4):321–8.
240. Balestrino D, Souweine B, Charbonnel N, Lautrette A, Aumeran C, Traore O, et al. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Oct 1;24(10):3204–9.
241. Raad I, Hanna H, Dvorak T, Chaiban G, Hachem R. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan 1;51(1):78–83.
242. Mukherjee P, Mohamed S, Chandra J, Kuhn D, Liu S, Antar O, et al. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect Immun*. 2006 Jul 1;74(7):3804–16.
243. Onland W, Shin C, Fustar S, Rushing T, Wong W. Ethanol-lock technique for persistent bacteremia of long-term intravascular devices in pediatric patients. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006 Oct 1;160(10):1049.
244. Kubiak D, Gilmore E, Buckley M, Lynch R, Marty F, Koo S. Adjunctive management of central line-associated bloodstream infections with 70% ethanol-lock therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun;69(6):1665–8.
245. Tan M, Lau J, Guglielmo B. Ethanol locks in the prevention and treatment of catheter-related bloodstream infections. *Ann Pharmacother*. 2014 May 19;48(5):607–15.
246. Oliveira C, Nasr A, Brindle M, Wales P. Ethanol locks to prevent catheter-related bloodstream infections in parenteral nutrition: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2012 Feb 1;129(2):318–29.
247. Maiefski M, Rupp M, Hermsen E. Ethanol lock technique: review of the literature. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Nov 2;30(11):1096–108.

248. Slobbe L, Doorduyn J, Lugtenburg P, el Barzouhi A, Boersma E, van Leeuwen W, et al. Prevention of catheter-related bacteremia with a daily ethanol lock in patients with tunneled catheters: a randomized, placebo-controlled trial. Gold JA, editor. *PLoS One*. 2010 May 26;5(5):e10840.
249. Broom J, Krishnasamy R, Hawley C, Playford E, Johnson D. A randomised controlled trial of heparin versus ethanol lock therapy for the prevention of catheter associated infection in haemodialysis patients – the healthy-cath trial. *BMC Nephrol*. 2012 Dec 2;13(1):146.
250. Lown L, Peters B, Walraven C, Noverr M, Lee S. An optimized lock solution containing micafungin, ethanol and doxycycline inhibits *Candida albicans* and mixed *C. albicans* – *Staphylococcus aureus* biofilms. Nickels JT, editor. *PLoS One*. 2016 Jul 18;11(7):e0159225.
251. Sonmez M, Ince H, Yalcin O, Ajdžanović V, Spasojević I, Meiselman H, et al. The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. Bencharit S, editor. *PLoS One*. 2013 Sep 23;8(9):e76579.
252. Chi L, Wu W. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Feb 11;1062(1):46–50.
253. Redelman C, Maduakolam C, Anderson G. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Dec;66(3):411–8.
254. Milisavljevic V, Tran L, Batmalle C, Bootsma H. Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. *Am J Infect Control*. 2008 Oct;36(8):552–8.
255. Wolf J, Shenep J, Clifford V, Curtis N, Flynn P. Ethanol lock therapy in pediatric hematology and oncology. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Jan;60(1):18–25.
256. Mermel L, Alang N. Adverse effects associated with ethanol catheter lock solutions: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Oct 1;69(10):2611–

- 9.
257. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):288–356.
258. Ghannoum M. Susceptibility testing of fungi and correlation with clinical outcome. *J Chemother*. 1997 May;9 Suppl 1:19–24.
259. EUCAST, European Committee on Antimicrobial susceptibility testing. Clinical breakpoints [Internet]. 2016. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
260. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *EUCAST*. 2016;35–44.
261. Hawser S. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. *J Med Vet Mycol*. 1996;34(6):407–10.
262. Da Silva W, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa E, Samaranayake L, Del Bel Cury A. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008;19(4):364–9.
263. Peeters E, Nelis H, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008 Feb;72(2):157–65.
264. Borra R, Lotufo M, Gagiotti S, Barros F, Andrade P. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res*. 2009 Jul-Sep;23(3):255–62.
265. Doern G. Antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep 1;49(9 Supplement):S4–S4.
266. Neu T, Manz B, Volke F, Dynes J, Hitchcock A, Lawrence J. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010 Apr;72(1):1–21.
267. Boulou L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight:

- application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods*. 1999 Jul;37(1):77–86.
268. Rumbaugh K, Carty N. In vivo models of biofilm Infection. In: *Biofilm Infections*. New York, NY: Springer New York; 2011 Oct. p. 267–90.
269. Rupp M, Ulphani J, Fey P, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun*. 1999 May;67(5):2656–9.
270. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*. 2004 Oct 1;72(10):6023–31.
271. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Dell'Acqua G, Orlando F, Mocchegiani F, et al. RNAIII-inhibiting peptide significantly reduces bacterial load and enhances the effect of antibiotics in the treatment of central venous catheter-associated *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis*. 2006 Jan 15;193(2):180–6.
272. Kokai-Kun J, Chanturiya T, Mond J. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Jul;64(1):94–100.
273. Almirante B, Pahissa A. Actualización en infecciones relacionadas con el uso de catéteres vasculares. Marge Medica Books; 2013. 251 p.
274. Raad I, Fang X, Keutgen X, Jiang Y, Sherertz R, Hachem R. The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Aug;21(4):385–92.
275. Capdevila J, Gavaldà J, Fortea J, López P, Martín M, Gomis X, et al. Lack of antimicrobial activity of sodium heparin for treating experimental catheter-related infection due to *Staphylococcus aureus* using the antibiotic-lock technique. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Apr;7(4):206–12.
276. Almirante B, Rodríguez D, Park B, Cuenca-Estrella M, Planes A, Almela M, et al.

- Epidemiology and predictors of mortality in cases of candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr 1;43(4):1829–35.
277. Understanding Animal Research [Internet]. [cited 2018 Feb 4]. Available from: <http://www.understandinganimalresearch.org.uk/why/human-health>
278. Kamagata-Kiyoura Y, Nitta T, Abe S, Yamaguchi H. Detachment activity of human saliva in vitro for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate. *J Infect Chemother.* 2003 Sep;9(3):215–20.
279. Pierce C, Uppuluri P, Tummala S, Lopez-Ribot J. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J Vis Exp.* 2010 Oct 21;(44).
280. Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008 Dec 1;3(12):1909–24.
281. Cuéllar-Cruz M, Vega-González A, Mendoza-Novelo B, López-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza M, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct 12;31(10):2513–27.
282. Baillie G, Douglas L. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* 1999 Jul 1;48(7):671–9.
283. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2000 Dec;24(5):661–71.
284. Rochford E, Richards R, Moriarty T. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Dec;18(12):1162–7.
285. Vandeputte P, Tronchin G, Larcher G, Ernoult E, Bergès T, Chabasse D, et al. A nonsense mutation in the *ERG6* gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct 1;52(10):3701–9.
286. Johnson D, Johnson F, Goldman S. Preliminary results treating persistent central

- venous catheter infections with the antibiotic lock technique in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J.* 1994 Oct;13(10):930–1.
287. Buckler B, Sams R, Goei V, Krishnan K, Bemis M, Parker D, et al. Treatment of central venous catheter fungal infection using liposomal amphotericin-B lock therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Aug;27(8):762–4.
288. Öcal D, Dolapçı İ, Gençtürk Z, Tekeli A. In vitro effect of vancomycin and daptomycin on biofilm formation of coagulase-negative staphylococci strains. *Mikrobiyol Bul.* 2017 Jul 10;51(3):220–35.
289. Hall Snyder A, Vidailac C, Rose W, McRoberts J, Rybak M. Evaluation of high-dose daptomycin versus vancomycin alone or combined with clarithromycin or rifampin against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* in a novel in vitro PK/PD model of bacterial biofilm. *Infect Dis Ther.* 2015 Mar;4(1):51-65.
290. Margarida Pereira A, Cristina Abreu A, Simões M. Action of kanamycin against single and dual species biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Res.* 2012 Aug 31;2(4):84–8.
291. Naylor P, Myrvik Q, Gristina A. Antibiotic resistance of biomaterial-adherent coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *Clin Orthop Relat Res.* 1990 Dec;(261):126–33.
292. Webb L, Holman J, de Araujo B, Zaccaro D, Gordon E. Antibiotic resistance in staphylococci adherent to cortical bone. *J Orthop Trauma.* 1994;8(1):28–33.
293. Qu Y, Daley A, Istivan T, Rouch D, Deighton M. Densely adherent growth mode, rather than extracellular polymer substance matrix build-up ability, contributes to high resistance of *Staphylococcus epidermidis* biofilms to antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jul 1;65(7):1405–11.
294. Gomes L, Silva L, Simões M, Melo L, Mergulhão F. *Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials. *J Biomed Mater Res Part A.* 2015 Apr;103(4):1414–23.
295. Arciola C, Campoccia D, Montanaro L. Effects on antibiotic resistance of

- Staphylococcus epidermidis following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials*. 2002 Mar;23(6):1495–502.
296. Salma M, Rousseaux S, Sequeira-Le Grand A, Divol B, Alexandre H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. de Crécy-Lagard V, editor. *PLoS One*. 2013 Oct 29;8(10):e77600.
297. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, et al. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jul;18(7):E259–61.
298. Sandvik E, McLeod B, Parker A, Stewart P. Direct electric current treatment under physiologic saline conditions kills *Staphylococcus epidermidis* biofilms via electrolytic generation of hypochlorous acid. Otto M, editor. *PLoS One*. 2013 Feb 4;8(2):e55118.
299. Schmidt-Malan S, Karau MJ, Cede J, Greenwood-Quaintance K, Brinkman C, Mandrekar J, et al. Antibiofilm activity of low-amperage continuous and intermittent direct electrical current. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):4610–5.
300. Del Pozo J, Rouse M, Mandrekar J, Sampedro M, Steckelberg J, Patel R. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan 1;53(1):35–40.
301. Rubinsky L, Patrick B, Mikus P, Rubinsky B. Germicide wound pad with active, in situ, electrolytically produced hypochlorous acid. *Biomed Microdevices*. 2016 Apr 18;18(2):26.
302. Gray M, Wholey W, Jakob U. Bacterial responses to reactive chlorine species. *Annu Rev Microbiol*. 2013 Sep 8;67(1):141–60.
303. Sam C, Lu H. The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. *J Dent Sci*. 2009 Jun;4(2):45–54.

304. McKenna S, Davies K. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem J.* 1988 Sep 15;254(3):685–92.
305. Gavaldà J, Puntès V, Torrents E. System, method and uses for “in situ” treatment or prevention of antimicrobial resistant infections or infections difficult to be treated. WO2017149381 (A1)-2017-09-08)16, 2016.

XI. ANNEX

XI. ANNEX

ANNEX 1: Article pendent de publicació: Eficàcia de l'anidulafungina en el tractament d'infecció de catèter experimental per *Candida parapsilosis* utilitzant la tècnica de l'*antifungal lock*.

TREBALL 2: Eficàcia de l'amfotericina B liposomal i l'anidulafungina utilitzant la tècnica de l'*antifungal lock* en el tractament d'infecció de catèter experimental per *Candida albicans* i *Candida glabrata*.

Títol original: "Efficacy of liposomal amphotericin B and anidulafungin using an *antifungal lock technique* (ALT) for catheter-related *Candida albicans* and *Candida glabrata* infections".

Autors: Jana Basas¹, Marta Palau¹, Xavier Gomis¹, Benito Almirante¹, Joan Gavaldà¹.

¹ Laboratori de Malalties Infeccioses, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya.

Objectiu: Avaluar l'eficàcia de l'anidulafungina *versus* l'amfotericina B liposomal (LAmB) pel tractament d'infecció experimental de catèter enfront *Candida albicans* i *Candida glabrata* mitjançant la tècnica de l'*antifungal lock technique* (ALT).

Materials i Mètodes: Es van estudiar dues soques clíniques de *C. albicans* (CA176 i CA180) i dues de *C. glabrata* (CG171 i CG334). Es van realitzar estudis *in vitro* per determinar les concentracions mínimes eradicadores del *biofilm* al 90% (CMEB₉₀) en discos de silicona elastomer i després de 48 hores de tractament amb anidulafungina i LAmB. Es va utilitzar microscopia confocal per visualitzar la morfologia i viabilitat dels

llevats creixent en biopel·lícules. Pel model *in vivo* es va implantar un catèter intravenós en els conills *White New Zealand*. La infecció va ser induïda pel bloqueig del catèter durant 48 hores amb 0,35 mL d'inòcul de cada soca a estudiar. Els grups de tractament van consistir amb 48 hores d'ALT amb control (sèrum salí 0,9%), anidulafungina 3,33 mg/mL i LAmB 5 mg/mL.

Resultats: En el model experimental d'infecció de catèter per soques de *C. albicans*, els tractament d'ALT amb LAmB o anidulafungina van presentar una eficàcia similar. Per contra, en el model de *C. glabrata*, el tractament d'ALT amb anidulafungina, van obtenir una reducció significativa en comparació amb els altres grups de tractament, tant del recompte de \log_{10} d'UFC com del percentatge de negativització de les puntes dels catèters a les 48 hores de tractament.

Conclusions: Per les soques de *C. albicans*, tant la LAmB com l'anidulafungina poden ser tractaments d'*antifungal lock technique* prometedors per les infeccions de catèter de llarga durada. En contraposició, l'anidulafungina sembla ser més eficaç per tractar aquest tipus d'infeccions produïdes per *C. glabrata*. Així doncs, per les diferents espècies de *Candida*, la tècnica de l'*antifungal lock technique* pot ser una alternativa terapèutica a la retirada del catèter de llarga durada en els casos seleccionats de pacients en que aquesta no és possible.

Efficacy of liposomal amphotericin B and anidulafungin using an antifungal lock technique (ALT) for catheter-related *Candida albicans* and *Candida glabrata* infections

Jana Basas¹, Marta Palau¹, Xavier Gomis¹, Benito Almirante¹, Joan Gavalda¹#

¹ Antimicrobial Resistance Laboratory, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR). Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Running Title:

Antifungal lock therapy for *C. albicans* and *C. glabrata*.

Keywords:

Liposomal amphotericin B / anidulafungin / *C. albicans* / *C. glabrata* / catheter-related infection / *biofilm*.

#Corresponding author:

Joan Gavalda, M.D., Ph.D.

Antimicrobial Resistance Laboratory, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR).

E-mail address: joan.gavalda@vhir.org.

Tel.: +34 934894033; Barcelona, Spain.

Postal address: P. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

Abstract

Objective: To evaluate the effectiveness of liposomal amphotericin B (LAmB) and anidulafungin against *C. albicans* and *C. glabrata* strains *in vitro* and in a rabbit model of catheter-related infection using the antifungal lock technique (ALT).

Methods: Two *C. albicans* and two *C. glabrata* clinical strains were used. The MBEC₉₀ values were determined after 48h of treatment with LAmB and anidulafungin. Confocal microscopy was used to visualize the morphology and viability of yeasts growing in *biofilms*. Central venous catheters were inserted into New Zealand rabbits, which were inoculated of each strain of *C. albicans* and *C. glabrata*. Then, catheters were treated for 48 h with saline or with ALT using either LAmB (5 mg/mL) or anidulafungin (3.33 mg/mL).

Results: In the experimental model of *C. albicans* catheter-related infection, lock therapy with LAmB or with anidulafungin had similar efficacy. In contrast, in *C. glabrata* model, anidulafungin lock therapy achieved significantly better results compared to the other treatments.

Conclusions: For the *C. albicans* strains, both LAmB and anidulafungin may be promising ALT for long-term catheter-related infections; however, anidulafungin showed significantly higher activity than LAmB against the *C. glabrata* strains. Antifungal lock technique was an alternative to catheter removal for selected cases of long-term catheter-related bloodstream infections caused by *Candida* spp.

Keywords:

Liposomal amphotericin B / anidulafungin / *C. albicans* / *C. glabrata* / catheter-related infection / *biofilm*.

Introduction

Candida spp. are the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infection (BSI) worldwide with an incidence of 8.1 cases/100 000 inhabitants in Spain during the years 2010-2011 and an attributable mortality rate of 31%.¹

Although *Candida albicans* remains globally the most common fungal isolate from blood, substantial increases in the prevalence of non-*albicans* *Candida* spp. have been reported, with proportions of 45 and 55%, respectively.^{1,2} Cases of non-*albicans* *Candida* BSI are commonly caused by *Candida parapsilosis* (24.9%), *Candida glabrata* (13.4%) and *Candida tropicalis* (7.7%).^{1,2}

Central venous catheters (CVCs) appear to be the most common risk factor for the development of candidemia in patients without neutropenia or major immunodeficiencies. These infections are closely related to the ability of *Candida* to form biofilms on artificial surfaces;^{3,4} this ability poses an important therapeutic issue because fungal cells encased in biofilms are known to display a reduced susceptibility to antifungals compared to their planktonic counterparts.⁴ The treatment of long-term catheter-related BSI (CRBSI) caused by *Candida* spp. requires the removal of the catheter and systemic treatment with fluconazole or an echinocandin for two weeks,^{5,6} although some studies have noted that the impact of this practice has failed to improve the outcome in subgroups of patients.⁷ On the other hand, catheter removal is not always possible (i.e., in subsets of patients who have a surgically implantable catheter with no other available vascular access or who have profound thrombocytopenia); thus, the need arises for a therapeutic option that allows the conservative management of the catheter-related infection, such as the antifungal lock technique (ALT), which consists of locking catheters with a high concentration of an antifungal solution.⁸ This conservative strategy would be useful in select circumstances, for example, in uncomplicated cases in which catheters are infected with *Candida* spp. but are greatly needed or unsafe to remove. Few investigations published to date have been focused on the *in vivo* usefulness of ALT to treat *C. albicans* and *C. glabrata* catheter-related infections.⁹ According to The

Infectious Diseases Society of America (IDSA),⁶ the data are insufficient to support specific recommendations for the use of ALT for catheter salvage in the management of CRBSI caused by *Candida* spp.

This study had two purposes. The first purpose was to assess the *in vitro* susceptibility of *C. albicans* and *C. glabrata* growing on silicone discs to LAmB and anidulafungin, and the second purpose was to assess the effectiveness of anidulafungin at 3.33 mg/mL compared with LAmB at 5 mg/mL for the treatment of experimentally induced *C. albicans* and *C. glabrata* catheter-related infections by the antifungal lock technique.

Materials and methods

Strains

Four well-characterized *biofilm*-producing *Candida* spp. strains were used. Two *C. albicans* (CA176 and CA180) and two *C. glabrata* (CG171 and CG334) strains were isolated from patients with CRBSI. For quality control, the ATCC *C. parapsilosis* 22019 reference strain was used. The strains were stored at -80°C in skim milk.

Antifungals

Liposomal amphotericin B (LAmB) was provided by Gilead Sciences, Inc. (Madrid, Spain), and anidulafungin was provided by Pfizer, Inc. (Madrid, Spain). For the *in vivo* animal model of infection, the concentrations used were 5 mg/mL for LAmB and 3.33 mg/mL for anidulafungin. These concentrations were the highest possible due to the concentration provided in the commercial drug vial. The drug dilutions were prepared according to the manufacturers' instructions. The treatments were supplemented with 100 IU/mL of sodium heparin.

***In vitro* studies**

Susceptibility studies

The MICs of LAmB and anidulafungin for the two *C. albicans* and the two *C. glabrata* strains were determined by the broth microdilution method according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines and breakpoints.¹⁰ For the *biofilm* formation assay, we followed the protocol described by Chandra *et al.*,¹¹ with slight modifications. The *C. albicans* and *C. glabrata* strains were grown overnight in Yeast Nitrogen Base medium (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) with 50 mM dextrose (YNBD) at 37°C with continuous shaking at 60 rpm. After centrifugation, the cultures were washed twice with sterile PBS (pH 7.2) and were resuspended at a final concentration of $1 \cdot 10^7$ blastoconidia/mL. Then, inocula were applied to 12-well plates, and silicone elastomer discs (15 mm diameter x 1.5 mm; Merfasa SL, Barcelona, Spain) were added. The silicone discs were incubated for 90 min at 37°C and were then placed in a new plate containing brain heart infusion (BHI; Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) medium. These plates were incubated for 48 h at 37°C with continuous shaking at 60 rpm. The silicone discs that contained the fungal biofilm were placed on a new plate containing various two-fold dilutions of LAmB and anidulafungin and were incubated at 37°C for 48 h. For the evaluation of the minimum biofilm eradication concentration for 90% eradication (MBEC₉₀), the silicone discs were placed in a new plate with fresh BHI. The biofilm was scraped (Sarstedt, Inc., Newton, NC, USA) and serially diluted, and the yeast cells were enumerated by the viable count method. The MBEC₉₀ was defined as the minimum concentration of antimicrobial required to reduce the biofilm cell numbers (relative to the initial inoculum size) by $\geq 90\%$.¹² All experiments were performed in triplicate.

Confocal laser scanning microscopy assay

The effect of different concentrations of LAmB and anidulafungin on the growth of *C. albicans* and *C. glabrata* biofilm on silicone discs was visualized using confocal laser scanning microscopy (CLSM) with an Olympus FV1000 microscope with excitation wavelengths of 488 and 568 nm. The biofilms were stained using a Live/Dead®

BacLight™ Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, The Netherlands). Briefly, this technique consisted of staining the cells encased in the biofilm with a mixture of SYTO 9 (3.34 mM solution in DMSO) and propidium iodide (20 mM solution in DMSO) and incubating at room temperature in the dark for 30 min to distinguish between dead cells and cells that remained alive after antifungal exposure. Three areas of the biofilm on each silicone disc were scanned with a 2 µm step size. Simultaneous dual-channel imaging was used to display the green and red fluorescence. The IMARIS 8 software (Bitplane, Belfast, UK) was used to create a projection view of the formed biofilms, and the ImageJ 1.45s software package (developed at the National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used to calculate the percentage of green (live) and red (dead) pixels. All experiments were performed in triplicate.

***In vivo* studies**

Ethics statement

The experimental protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Vall d'Hebron Research Institute (registration number 73.12 CEEA) and the Ministry of Environment of the Catalan Government (registration number 7863).

Catheter-related infection model

The animal model was based on our previous studies.¹² New Zealand white male rabbits (Granja Riera, Barcelona, Spain) weighing 2.0 to 2.2 kg were singly housed under a reversed 12 h/12 h light/dark cycle with water and food ad libitum throughout the experiment. Briefly, a catheter made of sterile silicone tubing (SILASTIC®, ID/OD: 0.45/0.77 inch, Dow Corning Corporation, MI, USA) was inserted into the internal jugular vein at a depth of up to 8 cm and secured with silk suture. After placement, the catheters were inoculated with 0.35 mL of a suspension containing $1 \cdot 10^7$ blastoconidia/mL of *C. albicans* and *C. glabrata*. The inoculum was locked in the lumen of the catheter for 48 h and was carefully withdrawn by aspiration immediately before starting ALT. The

treatment groups were as follows: untreated control (normal saline 0.9%), LAmB at 5 mg/mL and anidulafungin at 3.33 mg/mL. The catheters were locked with 0.4 mL of each treatment for 48 h. Then, the animals were euthanized, and the catheters were removed for microbiological evaluation. The distal 4 cm of each catheter was cut, submerged in BHI and sonicated at 50 Hz for 10 min for quantitative culture. The sonication products were washed twice by centrifugation, and the pellet was serially diluted, plated, and incubated on Sabouraud agar (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) plates for 48 h at 37°C. After incubation, a colony count was performed. The results were expressed as log₁₀ total colony-forming units (CFU).

Statistical analysis

The catheters yielding negative results were compared. The percentage of negative cultures obtained in each treatment was analysed using Fisher's exact test, and the mean of log₁₀ CFU recovered from the catheter tips was compared using one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* test. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) version 16 package program. P-values of ≤ 0.05 were considered statistically significant. P-values > 0.05 were not statistically significant (p NS).

Results

***In vitro* studies**

Susceptibility studies

The results of the susceptibility study can be seen in **Table 1**; the *C. albicans* and *C. glabrata* isolates used in our study were susceptible to both LAmB and anidulafungin, according to the interpretation of susceptibility defined by the most recent EUCAST breakpoints.¹⁰

Anidulafungin was >1000-fold more effective than LAmB against both *C. albicans* strains growing on silicone discs (MBEC₉₀ anidulafungin vs. MBEC₉₀ LAmB: CA176, 0.03 vs. 128 mg/L; CA180, 0.5 vs. 64 mg/L).

For the *C. glabrata* strains growing on silicone discs, anidulafungin was >10 and >100-fold more effective than LAmB against the CG171 and CG334 strains, respectively (MBEC₉₀ anidulafungin vs. MBEC₉₀ LAmB: CG171, 0.5 vs. 64 mg/L; CG334, 2 vs. 32 mg/L).

Table 1. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains to LAmB and anidulafungin.

Strain	LAmB		Anidulafungin	
	MIC (mg/L)	MBEC ₉₀ (mg/L)	MIC (mg/L)	MBEC ₉₀ (mg/L)
CA176	0.5	128	0.0017	0.03
CA180	0.5	64	0.0035	0.5
CG171	1	64	0.015	0.5
CG334	0.5	32	0.007	2

LAmB, Liposomal Amphotericin B; MIC, minimum inhibitory concentration; MBEC₉₀, minimum biofilm eradication concentration for 90% eradication.

Confocal laser scanning microscopy assay

CLSM was used to visualize the morphology and viability of *Candida* spp. growing on silicone discs for 48 h using a Live/Dead® staining technique. **Figures 1 (a) (b) and 2 (a) (b)** represent the percentage of viable cells after 48 h of treatment against the tested strains of *C. albicans* and *C. glabrata*, respectively.

At high concentrations, LAmB and anidulafungin had similar effects on the reduction of cell viability in the biofilms of both *C. albicans* strains. The reduction in cell viability due

to treatment with anidulafungin at 3,333 mg/L approached or exceeded 90% for both the CA176 (**Figure 1a**) and CA180 (**Figure 1b**) strains; LAmB at 5000 mg/L had a similar effect.

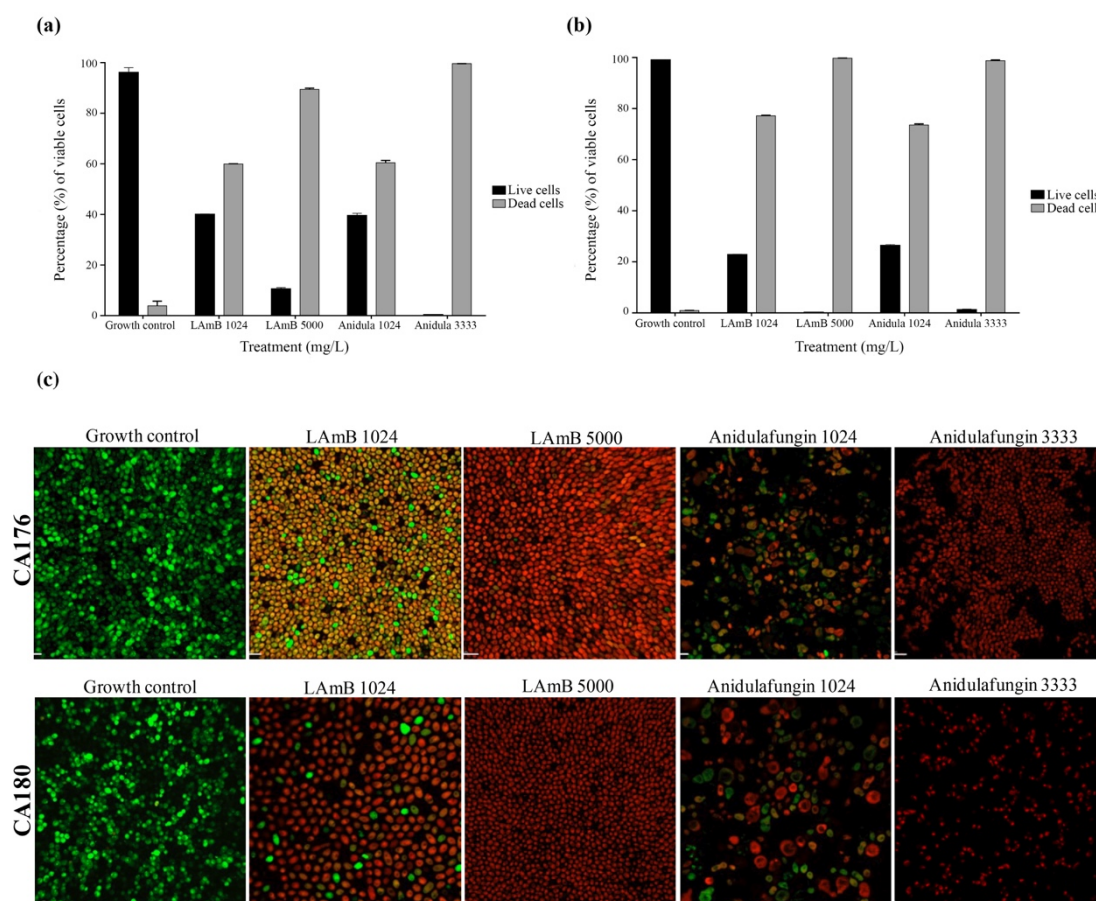


Figure 1. Viability assay of *Candida albicans* biofilm. **(a)** Viability of CA176. **(b)** Viability of CA180. **(c)** Live/Dead® fluorescence imaging of CA176 and CA180. LAmB, Liposomal amphotericin B; anidula, anidulafungin.

Regarding the *C. glabrata* strains, the effects of high concentrations of LAmB and anidulafungin were different for the two strains studied. Anidulafungin at 3,333 mg/L demonstrated better efficacy (87% cell death) than LAmB at 5000 mg/L against the CG171 strain (**Figure 2a**). In contrast, LAmB and anidulafungin had a similar effect (cell death greater than 90%) against the CG334 strain (**Figure 2b**). Note that in response to

anidulafungin at a low concentration of 0.06 mg/L, the reduction in *C. glabrata* viability was greater than 70% for both strains (CG171: 70%; CG334: 96%).

The visualization of *Candida* spp. morphology by CLSM (Figure 1c and 2c: 60x magnification) revealed small, ovoid colonies in the groups treated with different concentrations of LAmB and high concentrations of anidulafungin; this morphology was the same as that observed in the growth control group. Interestingly, we observed a large, globose morphology in the *C. albicans* strains when biofilms of these strains were treated with low concentrations of anidulafungin, suggesting a structural defect in the cell surface of these strains. However, this effect was not observed in the *C. glabrata* strains.

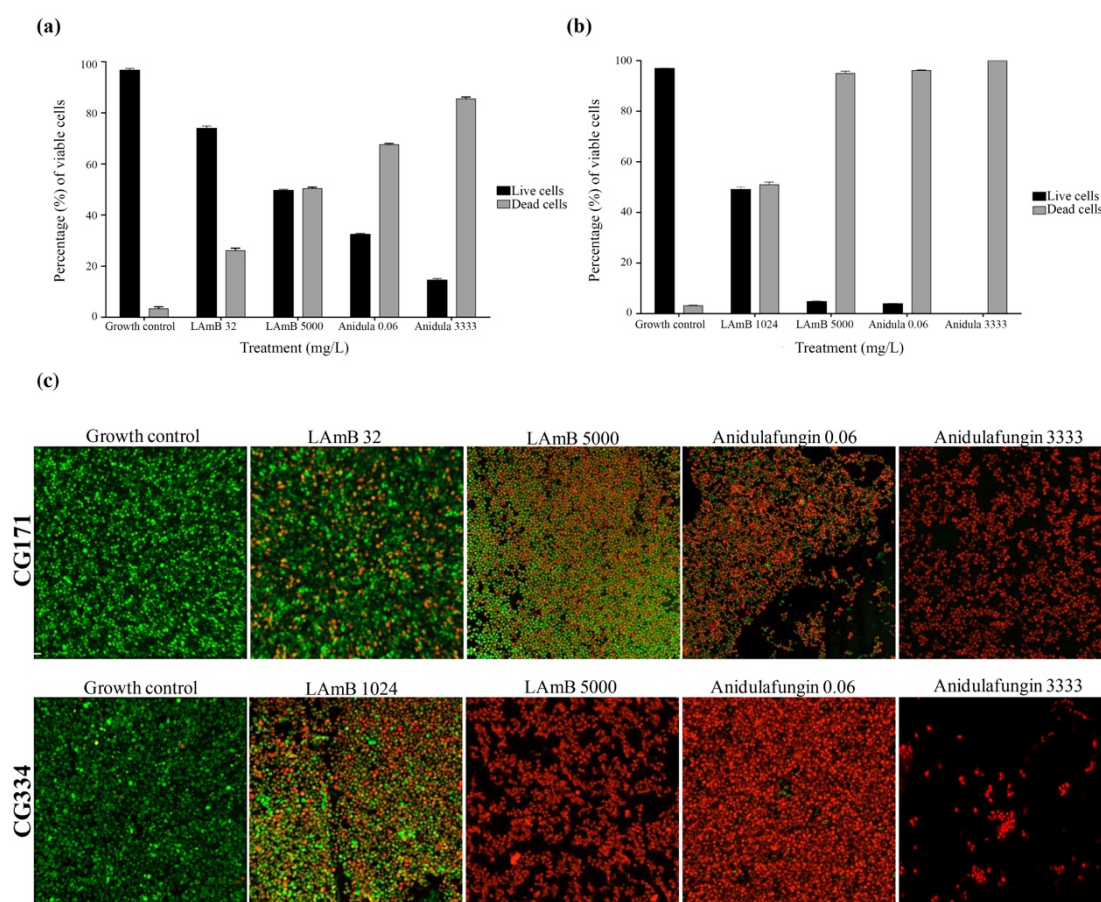


Figure 2. Viability assay of *Candida glabrata* biofilm. **(a)** Viability of CG171. **(b)** Viability of CG334. **(c)** Live/Dead® fluorescence imaging of CG171 and CG334. LAmB, Liposomal amphotericin B; anidula, anidulafungin.

***In vivo* studies**

Catheter-related infection model

The results obtained from the rabbit catheter tip cultures after sonication and centrifugation are shown in **Table 2**. For catheter-related infection due to either strain of *C. albicans*, the fungal load recovered from the catheter tips in both the anidulafungin- or LAmB-lock therapies treated animals and the untreated control animals was similar (CA176: $3.6 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU, $p \leq 0.0001$; CA180: $3.8 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU, $p \leq 0.01$). However, there were differences between the two strains with respect to the negativization of the catheter tips. In the rabbits infected with the CA176 strain, only half of the catheters in the LAmB lock therapy group were sterile (control group: 0%; anidulafungin group: 40%; $p \leq 0.05$ vs. untreated control group). In the animals infected with the CA180 strain, the anidulafungin- and LAmB-lock therapies achieved the same rate of catheter tip negativization as did no treatment (83% in both treatments, $p \leq 0.01$).

In the animals infected with either strain of *C. glabrata*, the colony counts from the catheter tips after 48 h of antifungal lock therapy were significantly lower in the animals treated with lock therapy with anidulafungin than in those treated with lock therapy with LAmB (CG171, $p \leq 0.05$; CG334, $p \leq 0.01$). Compared with no treatment, lock therapy with anidulafungin at 3,33 mg/mL resulted in a significant reduction in CFU recovered from the catheter tips; this reduction was more than $4.8 \log_{10}$ CFU for both strains of *C. glabrata* (CG171: $4.8 \log_{10}$ CFU, $p \leq 0.0001$; CG334: $5.1 \log_{10}$ CFU, $p \leq 0.0001$). Note that anidulafungin at 3,33 mg/mL was the only antifungal treatment that resulted in a significant percentage of negative catheter cultures for both strains after 48 h: 64% for strain CG171 (control: 0%; LAmB 5 mg/mL: 21%; $p \leq 0.05$) and 100% for strain CG334 (control: 0%; LAmB 5 mg/mL: 29%; $p \leq 0.01$).

Table 2. Results of antifungal lock therapy for *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains.

Treatment	<i>C. albicans</i> strains				<i>C. glabrata</i> strains			
	CA176		CA180		CG171		CG334	
	Negative / total (%)	Log ₁₀ CFU (mean ± SD [95% CI])	Negative / total (%)	Log ₁₀ CFU (mean ± SD [95% CI])	Negative / total (%)	Log ₁₀ CFU (mean ± SD [95% CI])	Negative / total (%)	Log ₁₀ CFU (mean ± SD [95% CI])
Control	0/10 (0)	5.1 ± 0.5 (4.8-5.5)	0/4 (0)	4.0 ± 1.0 (2.5-5.5)	0/10 (0)	5.7 ± 0.4 (5.5-6.1)	0/7 (0)	5.1 ± 0.7 (4.4-5.8)
LAmB 5 mg/mL	5/10 (50) ^a	1.2 ± 1.3 (0.2-2.0) ^b	5/6 (83) ^c	0.3 ± 0.8 (0.5-1.2) ^c	3/14 (21)	2.1 ± 1.2 (1.4-2.8) ^b	2/7 (29)	1.4 ± 1.0 (0.4-2.3) ^b
Anidula 3.33 mg/mL	4/10 (40)	1.8 ± 1.5 (0.7-2.9) ^b	5/6 (83) ^c	0.2 ± 0.7 (0.4-1.0) ^c	7/11 (64) ^{c,d}	0.9 ± 1.3 (0.1-1.8) ^{b,d}	8/8 (100) ^{b,e}	0.0 ± 0.0 (0.0-0.0) ^{b,e}

The results are given as the ratio of the negative catheter cultures to the total number of catheters (expressed as percentages), and the median total CFU (expressed in log₁₀ CFU).

LAmB, Liposomal amphotericin B; Anidula, Anidulafungin. ^a p ≤ 0.05 vs. control, ^b p ≤ 0.0001

vs. control and ^c p ≤ 0.01 vs. control. ^d p ≤ 0.05 vs. LAmB. ^e p ≤ 0.01 vs. LAmB

Discussion

This study had two purposes. The first purpose was to assess the *in vitro* susceptibility of *C. albicans* and *C. glabrata* growing on silicone discs to LAmB and anidulafungin, and the second purpose was to assess the effectiveness of anidulafungin at 3.33 mg/mL compared with LAmB at 5 mg/mL for the treatment of experimentally induced *C. albicans* and *C. glabrata* catheter-related infections by the antifungal lock technique.

Focusing on the *in vitro* MBEC₉₀ assays, we found that anidulafungin was more effective than LAmB against *C. albicans* and *C. glabrata* biofilms growing on silicone discs. In contrast, we obtained different results in the cell viability tests. Both anidulafungin at 3.33 mg/mL and LAmB at 5 mg/mL had a similar efficacy (cell death >90%) against *C. albicans* strains. In contrast, against *C. glabrata*, anidulafungin demonstrated better efficacy than LAmB against the CG171 strain, and both treatments (anidulafungin and LAmB) achieved a similar effect against the CG334 strain (cell death >90%).

Rapid salvage after catheter-related infection is likely to be clinically important because it allows earlier access to long-term catheters, thereby improving patient outcomes. This rapid salvage effect was obtained by lock therapy with either 3.33 mg/mL of

anidulafungin or 5 mg/mL of LAmB for 48 h in our experimental model of *C. albicans* catheter-related infection. Note that although both antifungals decreased the fungal load in the catheters infected with the two strains of *C. albicans*, a significant sterilization of the catheter tips was only achieved for one of the two strains studied. In contrast, in the experimental model of *C. glabrata* catheter-related infection, lock therapy with anidulafungin resulted in a significant reduction in fungal load recovered from the catheter tips compared to that achieved by LAmB for both strains. Likewise, only anidulafungin treatment resulted in negative catheter tip cultures. These data are in accordance with our previous published study, in which lock therapy with anidulafungin showed the highest activity against experimental catheter-related *C. parapsilosis* infection.¹² Our study thus identifies ALT as a fast and highly effective treatment that is an alternative to catheter removal for those selected cases; however, the ALT regimen assessed in our study is *Candida* species-dependent. For catheter-related infection by non-*albicans Candida* spp., such as *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, we could use lock therapy with anidulafungin, and for catheter-related *C. albicans* infection, we could use either anidulafungin or LAmB, assuming that the efficacy against some strain may be lower. Note that we would have to use high concentrations of either antifungal: 3.33 mg/mL of anidulafungin or 5 mg/mL of LAmB.

The minimal differences observed between the results of our *in vitro* efficacy studies of anidulafungin and LAmB against *C. albicans* and *C. glabrata* growing in biofilms and those of our animal model highlight the importance of testing treatments in experimental models. We acknowledge that the complexity of the environment surrounding intravascular catheters makes it difficult to accurately duplicate the *in vivo* conditions in the *in vitro* models. For example, despite the attempts to introduce an *in vitro* flow model, the flow characteristics of the host blood circulation cannot be satisfactorily emulated. It is also very complicated to include all host proteins and humoral immune components in these *in vitro* models. Accordingly, not even the most sophisticated technology could mimic the complicated interactions among cells, tissues and organs that occur in the

patient during catheter-related infection. It is our responsibility to search for the safest and most effective treatment for those patients who can benefit from it.

Our results are similar to those reported in an experimental model of *C. albicans* infection, which demonstrated no difference between ALT with caspofungin or LAmB;¹³⁻¹⁵ however, Schinabeck *et al.*,¹³ Chandra *et al.*,¹⁴ and Shuford *et al.*¹⁵ demonstrated catheter sterilization after 7 days of ALT with LAmB, deoxycholate AmB (dAmB), or caspofungin. Our studies only treat with ALT for 48 h because we believe that rapid clearance of the pathogen in an infected central venous catheter would likely be clinically important. In contrast to earlier findings, which argue that there were no differences between ALT with caspofungin or LAmB against *C. glabrata* isolates, our model of ALT demonstrates paradoxical behaviour of *C. glabrata* biofilms on the catheters in response to LAmB and anidulafungin.

In general, the published *in vitro* data have shown that dAmB and echinocandins such as caspofungin or micafungin have high activity against *C. albicans* and *C. glabrata* growing in biofilms.¹⁶ Nevertheless, anidulafungin and lipid formulations of AmB have been rarely investigated using *in vitro* susceptibility biofilm models. Oncu *et al.*¹⁷ tested the effect of dAmB compared with caspofungin against *C. albicans* on silicone catheter segments and demonstrated complete growth inhibition. Ramage *et al.*¹⁸ and Kawai *et al.*¹⁹ demonstrated a dose-dependent activity of LAmB against *C. albicans* and *C. glabrata* biofilms, a result similar to that observed in our study. Also in accordance with our findings, Cateau *et al.*²⁰ demonstrated the efficacy of 48 h of echinocandin (caspofungin and micafungin) treatment against young and mature biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata* on silicone catheter segments. In contrast to our results, Ko *et al.*²¹ did not show inhibition of biofilm growth in response to dAmB and echinocandin (caspofungin) treatment; the clearest explanation for these results is that polyurethane was used as the biofilm growth material, and as in our previous study,¹² other studies

have demonstrated that the adherence, formation and susceptibility of *Candida* spp. biofilms depends on the material to which the yeast attaches.²²⁻²⁴

Our results show that after exposing biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata* growing on silicone discs to different concentrations of LAmB and anidulafungin, the MBEC₉₀ antifungal concentration of obtained after the discs were scraped and cultivated in Sabouraud agar was lower than the viability observed with the Live/Dead® technique and visualized with CLSM. This finding is in agreement with the results of Salma *et al.*,²⁵ which showed the existence of a viable but nonculturable (VBNC) state in *S. cerevisiae*. The concept of a VNBC state has been thoroughly studied in bacteria but not in yeast, and our study is the first to describe such a state in *Candida* spp. This phenomenon is characterized by the ability of the cells to maintain detectable metabolic activity but an inability to grow on culture media, and it arises as the result of the stress response; in this case, the stress is a result of exposure to antifungals. The recovery of cultivability is possible if the stress is removed, but only if the cells were in this state for a short period of time.

Few data have been published regarding the conservative management of CRBSI caused by *Candida* spp. in humans. Imbert *et al.*¹⁶ have recently reviewed the literature discussing the antifungal solutions used for lock therapy and have reported all of the clinical studies with *C. albicans* and *C. glabrata*. Although it is well-recognized that the safest option for these patients is catheter removal, this measure is not always possible (i.e., if no alternative venous access exists, if the patient suffers from significant haemorrhagic diathesis, or if quality of life issues take priority over the need for the reinsertion of a new catheter at another site).⁶ Even in paediatric patients, in whom it is sometimes very difficult to establish a central line, some authorities have recommended trying in situ treatment for 72 h when the patient shows no clinical deterioration.²⁶ Regarding cases of catheter-related *C. albicans* infection; 5 out of 5 patients treated with

ALT using dAmB at 2 to 2.5 mg/mL demonstrated catheter salvage,²⁷⁻²⁹ and Buckler *et al.*³⁰ achieved a catheter salvage rate of 50% (1 out of 2 cases) using lock therapy with LAmB at 2.67 mg/mL. Four cases of catheter-related *C. glabrata* infection using lock therapy with AmB have been reported;²⁸ only 1 out of 3 cases achieved catheter salvage using dAmB at 2.5 mg/mL, and one patient was treated and cured by using ALT with dAmB at 5 mg/mL. Interestingly, the literature does not report the use of anidulafungin-lock therapy to treat catheter-related *C. albicans* or *C. glabrata* infection.

We consider a treatment duration of 48 h to be the turning point for maintaining long-term clinical outcomes and avoiding possible complications of infection; in the present study, anidulafungin at 3.33 mg/mL resulted in a higher percentage of negative catheter tip cultures at that time point.

In conclusion, ALT with anidulafungin provided a fast decrease in biofilm-embedded concentrations of *C. albicans* and *C. glabrata* and resulted in negative catheter tip cultures after 48 h of treatment in the majority of animals. For catheter-related *C. albicans* infection, ALT with either anidulafungin or Liposomal Amphotericin B was equally effective in eradicating infection, although one of the two tested strains did not attain negative catheter cultures at 48 h. Nevertheless, against *C. glabrata*, only ALT with anidulafungin at 3.33 mg/mL resulted in a high percentage of negative catheter tip cultures at the critical time point of 48 h; thus, this regimen may be useful as an antifungal lock therapy in the treatment of catheter-related infection due to *C. glabrata*. The results of this study support lock therapy with anidulafungin at 3.33 mg/L or Liposomal Amphotericin B at 5 mg/L as an adjunctive therapeutic option to systemic treatment in selected cases of long-term CRBSI caused by *C. albicans*. In patients with long-term CRBSI caused by *C. glabrata*, we recommend anidulafungin as an elective antifungal lock therapy.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070394) and was co-financed by the **European Development Regional Fund** “A way to achieve Europe” ERDF, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), and Pfizer, Inc.

We would like to acknowledge the professional manuscript services of Nature Publishing Group Language Editing. This work has been conducted within the framework of the Department of Medicine from the Universitat Autònoma de Barcelona.

References

- 1 Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):O245-54. Doi: 10.1111/1469-0691.12380.
- 2 Lamoth F, Lockhart S, Berkow E, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:i4–13. Doi: 10.1093/jac/dkx444.
- 3 Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(2):255–67. Doi: 10.1128/CMR.17.2.255-267.2004.
- 4 Chandra J, Zhou G, Ghannoum M. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets* 2005;6(8):887–94. Doi: 10.2174/138945005774912762.
- 5 Pappas PG, Kauffman C, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48(5):503–35. Doi: 10.1086/596757.
- 6 Mermel L, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-

- related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;49(1):1–45. Doi: 10.1086/599376.
- 7 Rodriguez D, Park BJ, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Planes a M, Mensa J, et al. Impact of early central venous catheter removal on outcome in patients with candidaemia. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(8):788–93. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01758.x.
- 8 Walraven CJ, Lee S. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57 1–8. Doi: 10.1128/AAC.01351-12.
- 9 Kucharíková S, Tournu H, Holtappels M, Van Dijck P, Lagrou K. In vivo efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(10):4474–5. Doi: 10.1128/AAC.00697-10.
- 10 EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *EUCAST* 2016:35–44.
- 11 Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum M. In vitro growth and analysis of candida biofilms. *Nat Protoc* 2008;3(12):1909–24. Doi: 10.1038/nprot.2008.192.
- 12 Basas J, Morer A, Ratia C, Martín MT, Del Pozo JL, Gomis X, et al. Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(10):2895–901. Doi: 10.1093/jac/dkw251.
- 13 Schinabeck MK, Long L, Hossain M, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S, et al. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1727–32. Doi: 10.1128/AAC.48.5.1727-1732.2004.
- 14 Chandra J, Long L, Ghannoum M, Mukherjee PK. A rabbit model for evaluation of catheter-associated fungal biofilms. *Virulence* 2011;2(5):466–74. Doi: 10.4161/viru.2.5.16341.

- 15 Shuford JA, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. *J Infect Dis* 2006;194:710–3. Doi: 10.1086/506452.
- 16 Imbert C, Rammaert B. What could be the role of antifungal lock-solutions? from bench to bedside. *Pathogens* 2018;7(1):6. Doi: 10.3390/pathogens7010006.
- 17 Öncü S. In vitro effectiveness of antifungal lock solutions on catheters infected with *Candida* species. *J Infect Chemother* 2011;17(5):634–9. Doi: 10.1007/s10156-011-0224-3.
- 18 Ramage G, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Jones B, Williams C. Liposomal amphotericin b displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(5):2369–71. Doi: 10.1128/AAC.02344-12.
- 19 Kawai A, Yamagishi Y, Mikamo H. In vitro efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-*albicans* *Candida* species biofilms. *J Infect Chemother* 2015;21(9):647–53. Doi: 10.1016/j.jiac.2015.05.007.
- 20 Cateau E, Rodier MH, Imbert C. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(1):153–5. Doi: 10.1093/jac/dkn160.
- 21 Ko KS, Lee Ji Young, Song Jae Hoon, Peck Kyong Ran. In vitro evaluation of antibiotic lock technique for the treatment of *candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* biofilms. *J Korean Med Sci* 2010;25(12):1722–6. Doi: 10.3346/jkms.2010.25.12.1722.
- 22 Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 2011:241–7. Doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003.
- 23 Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Samaranayake LP, et al. Architectural analysis, viability assessment and growth

- kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol* 2009;54(11):1052–60. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.08.002.
- 24 Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods* 2011;86(2):238–42. Doi: 10.1016/j.mimet.2011.05.019.
- 25 Salma M, Rousseaux S, Sequeira-Le GA, Divol B, Alexandre H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2013;8(10):e77600. Doi: 10.1371/journal.pone.0077600.
- 26 Castagnola E, Marazzi MG, Tacchella A, Giacchino R. Broviac catheter-related candidemia. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(8):747.
- 27 Johnson DC, Johnson FL, Goldman S. Brief report. Preliminary results treating persistent central venous catheter infections with the antibiotic lock technique in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13(10):930–1.
- 28 Benoit JL, Carandang G, Sitrin M, Arnow PM. Intraluminal antibiotic treatment of central venous catheter infections in patients receiving parenteral nutrition at home. *Clin Infect Dis* 1995;21(5):1286–8.
- 29 Viale P, Petrosillo N, Signorini L, Puoti M, Carosi G. Should lock therapy always be avoided for central venous catheter-associated fungal bloodstream infections? *Clin Infect Dis* 2001;33(11):1947-8-51. Doi: 10.1086/323554.
- 30 Buckler BS, Sams RN, Goei VL, Krishnan KR, Bemis MJ, Parker DP, et al. Treatment of central venous catheter fungal infection using liposomal amphotericin-B lock therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27(8):762–4. Doi: 10.1097/INF.0b013e318170b68b.

