

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS MOLECULAR Y MICROBIOLÓGICO DE LA FORMACIÓN DE
BIOFILM EN *Staphylococcus hominis***

POR

Q.B.P. VERÓNICA VILLARREAL SALAZAR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA**

ENERO, 2018

ANÁLISIS MOLECULAR Y MICROBIOLÓGICO DE LA FORMACIÓN DE
BIOFILM EN *Staphylococcus hominis*

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente

Dra. Soraya Sarahí Mendoza Olazarán
Secretario

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

ANÁLISIS MOLECULAR Y MICROBIOLÓGICO DE LA FORMACIÓN DE
BIOFILM EN *Staphylococcus hominis*

Dirección de tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Director interno

Dra. Soraya Sarahí Mendoza Olazarán
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Facultad de Ciencias Biológicas** y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo administrativo y económico brindado durante la realización de este trabajo.

A la **Dra. Licet Villarreal Treviño** por siempre confiar en mí y aceptar la dirección de este trabajo. Por su apoyo incondicional, motivación y gran experiencia brindada para ayudar en mi crecimiento profesional y personal.

A la **Dra. Elvira Garza González** por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, poder colaborar y realizar esta investigación.

A la **Dra. Soraya S. Mendoza Olazarán** por su excelente asesoramiento, disponibilidad, paciencia, todos sus consejos y valiosa enseñanza, mil gracias.

Al **Dr. Juan F. Contreras Cordero**, **Dr. Carlos Hernández Luna**, y la **Dra. Lydia G. Rivera Morales** por formar parte del comité de este trabajo, su apoyo y colaboración.

A todo el **equipo de trabajo** del laboratorio por compartirme de sus conocimientos en todo momento.

A mis amigos y compañeros de posgrado: **Flora Cruz**, **Adrián Martínez**, **Jessica Gutiérrez**, **Hugo Sánchez** y **Laura Tijerina** por los gratos momentos juntos, todo su apoyo, consejos, opiniones y brindarme sus experiencias.

A **Imelda López Flores** por ser una maravillosa amiga, y siempre escucharme, ayudarme y aconsejarme.

A **Arturo Meléndez Martínez** por ser parte muy importante en mi vida, apoyarme en todo momento y siempre creer en mí.

A mi madre **Ma. Guadalupe Villarreal Salazar** por traerme a este mundo, siempre cuidar de mí y darme lo mejor. A mi tía **Juany Villarreal Salazar** por su gran amor, apoyo y consentirme siempre, además sin ustedes no hubiera llegado tan lejos y no sería lo que soy.

A mi abuelo **Juan Villarreal López** por ser como un padre para mí y enseñarme a hacer cosas nuevas y a mi abuela **Rosa E. Salazar Coronado** por siempre cuidar de mí y seguirlo haciendo ambos desde el cielo.

A toda mi **familia y amigos** por apoyarme siempre.

DEDICATORIA

A mis abuelos.

ÍNDICE

CONTENIDO	PAGINA
COMITÉ DE TESIS	i
DIRECCIÓN DE TESIS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de <i>Staphylococcus</i> spp.....	3
2.2 Características microbiológicas de <i>Staphylococcus hominis</i>	4
2.3 Relevancia clínica.....	5
2.4 Aislamiento e identificación.....	6
2.5 Patogenicidad y factores de virulencia.....	8
2.5.1 Formación de biofilm	9
2.5.2 Genes asociados a la formación de biofilm.....	10
2.5.3 Métodos de estudio del biofilm	10
2.5.4 Resistencia a antibióticos	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.1.2 Objetivos específicos	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Selección de los aislamientos	17
6.1.2 Criterios de inclusión y exclusión	17
6.2 Reactivación metabólica	17
6.3 Identificación nivel especie: MALDI-TOF	18
6.3.1 Método directo	18

6.3.2 Extracción en tubo.....	18
6.4 Nivel de producción de biofilm.....	19
6.5 Composición del biofilm.....	20
6.5.1 Composición del biofilm sin antibióticos.....	20
6.5.2 Composición del biofilm con antibióticos.....	21
6.6 Perfil de susceptibilidad a antibióticos.....	23
6.6.1 Preparación de las soluciones stock de los antibióticos.....	23
6.6.2 Preparación del panel de antibióticos.....	23
6.6.3 Células planctónicas.....	24
6.6.4 Células de biofilm.....	24
6.6.5 Detección del gen <i>mecA</i>	25
6.7 Análisis mediante ClinProTools.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Identificación.....	27
7.2 Nivel de producción de biofilm.....	28
7.3 Composición del biofilm.....	29
7.3.1 Composición del biofilm sin antibióticos.....	29
7.3.2 Composición del biofilm con concentraciones subinhibitorias de antibióticos... 30	
7.4 Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biofilm.....	32
7.4.1 Detección del gen <i>mecA</i>	34
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	47
10. PERSPECTIVAS.....	48
11. BIBLIOGRAFÍA.....	49
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	56
13. ANEXOS.....	57
A. Datos de los aislamientos.....	58
B. Nivel de producción de biofilm.....	62
C. Composición del biofilm sin antibióticos.....	66
D. Composición del biofilm con LZD.....	71
E. Composición del biofilm con VAN.....	73
F. Susceptibilidad a los antibioticos Parte 1.....	75
G. Susceptibilidad a los antibióticos Parte 2.....	81
H. Análisis estadístico.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Porcentaje de los aislamientos de ECN identificados mediante MALDI-TOF	28
2. Concentraciones mínimas inhibitorias en células planctónicas y de biofilm.	34
3. Detección del gen <i>mecA</i>	35
4 Análisis estadístico de los picos de interés en la producción de biofilm.	36
5. Análisis estadístico de los picos de interés relacionados con el gen <i>mecA</i>	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Nivel de producción de biofilm.....	29
2. Porcentaje de desprendimiento de biofilm.....	30
3. Porcentaje de desprendimiento de biofilm con concentraciones subinhibitorias de antibióticos.	31
4. Porcentajes de susceptibilidad y resistencia a antibióticos en células planctónicas ...	32
5. Porcentajes de resistencia a antibióticos en células planctónicas y de biofilm	33
6. Pico representativo de interés como marcador proteico entre los aislamientos productores y no productores de biofilm.,	37
7. Pico representativo de interés como marcador proteico entre los aislamientos con presencia y ausencia del gen <i>mecA</i>	38

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ECN	Estafilococcus coagulasa negativos
MALDI-TOF	Desorción/Ionización con Láser Asistida por Matriz Acoplada a un Analizador de Tiempo de Vuelo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMEB	Concentración mínima de erradicación de biofilm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIA	Adhesina intracelular de polisacárido
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
DO	Densidad óptica
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
r.p.m.	Revoluciones por minuto
V	Voltios
ANOVA	Análisis de varianza
m/z	Relación masa y carga
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
ml	Mililitros
μl	Microlitros
mg	Miligramos
μg	Microgramos
nm	Nanometros
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

Staphylococcus hominis es miembro del grupo de los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN), es comensal en piel de humanos y animales, causa infecciones como patógeno oportunista, principalmente en casos de bacteriemia nosocomial relacionadas al uso de dispositivos médicos invasivos. Esto es debido a la formación biofilm y su relación con el incremento en la farmacoresistencia. Se conoce muy poco acerca del biofilm de *S. hominis*, como su composición y la interacción entre antibióticos y biofilm, así como marcadores proteicos. El objetivo fue determinar el nivel de producción de biofilm, la susceptibilidad en células planctónicas y de biofilm y su composición con y sin concentraciones subinhibitorias de antibióticos y la búsqueda de marcadores proteicos de biofilm y del gen *mecA* en aislamientos clínicos de *S. hominis*. Se incluyeron 341 aislamientos de ECN identificados mediante MALDI-TOF. El nivel de producción de biofilm se realizó mediante la tinción con cristal violeta. Para la susceptibilidad a los antibióticos se obtuvo CMI y CMEB mediante el método de microdilución en caldo. La composición del biofilm con y sin concentraciones subinhibitorias de LZD y VAN se determinó mediante disrupción del biofilm con distintos sustratos específicos de cada componente. El análisis entre los espectros obtenidos por MALDI-TOF, se llevó a cabo mediante el software ClinProTools 3.0. Se obtuvieron 148 aislamientos de *S. hominis*, donde el 64.86% (96/148) fueron fuertes productores de biofilm, el 12.83% (19/148) fueron débiles y el 22.29% (33/148) no productores. La composición del biofilm mostró ser heterogénea donde el principal componente fueron las proteínas abarcando >80%, en el caso de carbohidratos y ADN, tuvieron variación de 2 a 90 %. La adición de concentraciones subinhibitorias de linezolid (LZD) y vancomicina (VAN) no afectó significativamente la composición de carbohidratos y proteínas, pero sí tuvo efecto sobre el ADN extracelular. Se observó que la resistencia a antibióticos fue mayor en células de biofilm que en células planctónicas, en estas últimas se observó mayor resistencia a oxacilina, eritromicina, trimetoprima-sulfametoxazol, clindamicina y azitromicina y una alta sensibilidad a linezolid y vancomicina. Dentro del biofilm se observó resistencia a todos los aislamientos. Se encontraron picos proteicos con potencial uso de marcadores moleculares y así determinar producción de biofilm y presencia del gen *mecA*.

ABSTRACT

Staphylococcus hominis belongs to the Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) group. It is commensal in the skin of humans and animals, causing infections as an opportunistic pathogen, mainly in cases of nosocomial bacteremia related to the use of indwelling medical devices. This is due to biofilm formation and its relation with the increase in antibiotic resistance. Very little is known about the biofilm of *S. hominis*, such as its composition and the interaction between antibiotics and biofilm formation, as well as protein markers. The objective was to determine the level of biofilm production, the susceptibility in planktonic and biofilm cells, their composition with and without subinhibitory concentrations of antibiotics and the search for biofilm and gene *mecA* protein markers in clinical isolates of *S. hominis*. Three hundred forty-one isolates of CoNS were included. These were identified by MALDI-TOF. The level of biofilm production was carried out by crystal violet staining. Antibiotic resistance was determined by the broth microdilution method. The composition of the biofilm with and without subinhibitory concentrations of LZD and VAN was determined by detachment assays. The analysis of proteomic profile was made by ClinProTools 3.0 software. One hundred forty-eight isolates of *S. hominis* were obtained, where 64.86% (96/148) were categorized as strong biofilm producers, 12.83% (19/148) as weak producers and 22.29% (33/148) as non-producers. The composition of the biofilm showed to be heterogeneous where the main component were proteins about >80%, in the case of carbohydrates and DNA varied 2 to 90%. The addition of subinhibitory concentrations of linezolid (LZD) and vancomycin (VAN) didn't affect significantly the amount of carbohydrates and proteins but they increased the eDNA. It was observed that resistance to antibiotics was higher in biofilm than in planktonic cells, which showed high resistance to oxacillin, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycin and azithromycin and a high sensitivity to linezolid and vancomycin. Antibiotic resistance was observed in all antibiotics in biofilm cells. Protein peaks with potential use of molecular markers were found to determine biofilm production and the presence of the *mecA* gene.

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus hominis es miembro del grupo de los ECN, es comensal en piel de humanos y animales. De igual manera que el resto de las especies de ECN, causa infecciones como patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. Las especies principalmente aisladas a partir de especímenes clínicos son *Staphylococcus epidermidis* cuya frecuencia es de aproximadamente 30-50%, seguido de *Staphylococcus haemolyticus* y *S. hominis*. En los últimos años se ha categorizado a *S. hominis* como causante de diversos tipos de infecciones intrahospitalarias, relacionadas principalmente con el uso de dispositivos médicos invasivos como el catéter (Becker *et al.* 2014; Farina *et al.* 2013).

El primer problema para establecer el diagnóstico de una infección por ECN es su errónea identificación a nivel especie debido a la estrecha relación bioquímica y genética entre los miembros de este grupo. Esto plantea la hipótesis de que pueden existir más casos de infecciones de especies poco frecuentes de ECN de las que realmente se reportan (Zhu *et al.* 2015). En los últimos años la espectrometría de masas (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) se ha posicionado como la herramienta de elección para la rápida identificación de los ECN a nivel especie, siendo un método sencillo y con alta especificidad >98%, comparado con métodos moleculares de referencia (Febbraro *et al.* 2016).

En comparación con *S. aureus* o *S. epidermidis*, los factores de virulencia son menos conocidos en *S. hominis*. Dentro de los más importantes se encuentra la capacidad para formar biofilm ya que es un paso crítico para establecer la adhesión y subsecuente colonización e infección. (Becker *et al.* 2014). Otro factor importante para considerar en las infecciones causadas por los ECN es la elevada frecuencia de resistencia a múltiples clases de antibióticos. Existen reportes de *S. hominis* multifarmacorresistente, incluso se

ha reportado con resistencia a los considerados antibióticos de último recurso de tratamiento, tales como la vancomicina y el linezolid. (Adballa *et al.* 2013, Szczuka *et al.* 2016). Existen reportes de aislamientos de *S. hominis* portadores del gen *mecA* que confiere resistencia a meticilina, y a otras penicilinas, el cual se encuentran dentro del Casete Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*, por sus siglas en inglés). Este casete fue reportado por primera vez cepas de *S. aureus*. El SCC*mec*, además de conferir resistencia a todos los antibióticos de la clase β -lactámicos, incrementa la resistencia en otros grupos de antibióticos y, por lo tanto, reduce el número de opciones terapéuticas, lo cual incrementa las tasas de morbimortalidad (Casey *et al.* 2007; Becker *et al.* 2014).

El incremento de la resistencia a antibióticos se ha asociado con diversos elementos genéticos y en la última década se ha asociado con la formación de biofilm, donde la resistencia puede aumentar hasta 1000 veces. Esto debido a que el biofilm, por su composición y estructura, le confiere protección a las células, limitando la exposición de la bacteria con los antibióticos (Davies 2003). Por este motivo es común que las células dentro del biofilm estén expuestas a concentraciones subinhibitorias de antibióticos, las cuales no son capaces de eliminar a las células bacterianas (Andersson y Hughes 2014). Existen estudios en *S. aureus* y *S. epidermidis* que demuestran que dentro del biofilm la expresión de los factores de virulencia de estas especies se ve afectada (Szczuka *et al.* 2017). Sin embargo, estos hallazgos no han sido descritos en cepas de *S. hominis*.

La determinación de la formación del biofilm *in vivo* mediante la tinción con cristal violeta es laborioso y tardado. Actualmente se buscan marcadores moleculares que faciliten su clasificación. Se han realizado estudios en donde se buscan marcadores proteicos mediante el uso de MALDI-TOF en conjunto con programas especializados como ClinProTools. Este conjunto es una herramienta en estudio donde se han reportado potenciales biomarcadores para la clasificación de aislamientos en base a su patrón de resistencia a algún antibiótico, o la diferenciación entre especies de un mismo género.(Xiao *et al.* 2014; Ketterlinus *et al.* 2005; Chen *et al.* 2015). No se han realizado estudios en donde se utilice esta herramienta para comparar el perfil proteico de *S. hominis*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Staphylococcus* spp.

El género *Staphylococcus* ha pasado por varias reclasificaciones, históricamente era clasificado junto con *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus* en la misma familia *Micrococcaceae*; sin embargo, el análisis de filogenia molecular reveló que varios de estos cocos Gram y catalasa positivos no estaban relacionados. Ahora la familia *Staphylococcaceae*, junto con las familias *Bacillaceae*, *Listeriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae* pertenecen al orden Bacillales de la clase *Bacilli* que es parte del phylum *Firmicutes*, el cual comprende de bacterias Gram positivas con una baja tasa de G+C contenida en el ADN. Dentro del género ha habido entrada y salida de especies, que con el paso de los años y nuevas técnicas moleculares fueron reclasificadas correctamente. Actualmente el género comprende de 47 especies y 23 subespecies, de estas 38 corresponden a las especies coagulasa negativa (Becker *et al.* 2014).

Actualmente todavía se utiliza un esquema muy simple pero muy útil basado en criterios clínicos y diagnósticos, que divide a este género en dos grupos: los estafilococos coagulasa positivos, que comprende casi exclusivamente a *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativos. El término coagulasa negativo proviene de la incapacidad de producir la enzima coagulasa, la cual activa un mecanismo alternativo en el plasma para convertir el fibrinógeno en fibrina con la formación final del coágulo (MacFaddin 2003).

Los estafilococos se encuentran distribuidos a lo largo de la piel de humanos y animales, donde las especies que colonizan lo hacen de acuerdo con las características del sitio anatómico. Morfológicamente son cocos Gram positivos de aproximadamente 0.8 – 1.3 μm de diámetro, no formadores de esporas, inmóviles, y son aerobios facultativos; pero pueden crecer por fermentación. Las células suelen acomodarse en grupos comúnmente en forma de racimos, aunque también se pueden encontrar en pequeñas cadenas, pares o solas. Todas las especies del género *Staphylococcus* son catalasa positiva, lo cual permite diferenciarlos de los *Streptococcus* que son catalasa

negativos. Son relativamente resistentes a desecación y toleran muy bien altas concentraciones de sal (NaCl), hasta un 7.5%, característica que proporciona un método de aislamiento selectivo en algunos medios de cultivo. En cuanto a la morfología macroscópica, forman colonias circulares, algunas tienen pigmentación que varía de color beige a amarillenta, son de apariencia cremosa, textura lisa, opacas, de tamaño aproximado a 1-2 mm de diámetro después de 24 h de incubación a 35-37 °C. Aunque comparten muchas similitudes entre las especies de ECN, cada una tiene características específicas que ayuda a diferenciar entre ellas (Frank *et al.* 2007; Madigan *et al.* 2015; Becker *et al.* 2014).

2.2 Características microbiológicas de *Staphylococcus hominis*

S. hominis es un miembro del grupo de los ECN. Se encuentra presente en piel de humanos y animales sanos, distribuido a lo largo de todo el cuerpo, principalmente en zonas de alta humedad cercanas a glándulas apocrinas (Kloos y Schleifer 1975). Esta especie se ha relacionado como uno de los responsables del olor corporal, puesto que se aísla en un alto porcentaje de estas áreas (Troccaz *et al.* 2015).

No se requiere de medios especiales para su cultivo, crecen bien en agar sangre en aerobiosis. Después de 24 h de incubación a 35-37°C se pueden observar colonias pequeñas de entre 3 a 4 mm de diámetro, algunas con β -hemólisis, circulares con borde regular, textura lisa y cremosas. La pigmentación es variable, pueden presentar un pigmento amarillento en el centro de colonias opacas, o colonias de color grisáceo blanquecino. Las colonias con más antigüedad (>2 días) pueden presentar anillos concéntricos de color claro a oscuro. Aeróbicamente produce ácido a partir de la glucosa, maltosa, fructosa y glicerol. Presenta baja tolerancia a sales (NaCl), y poca utilización del manitol (Kloos y Schleifer 1975).

Hasta la fecha solo se conocen dos subespecies: *S. hominis* subsp. *hominis* y *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* la principal diferencia reside en la sensibilidad o resistencia a novobiocina, respectivamente (Kloos *et al.* 1998).

2.3 Relevancia clínica

Hace más de 50 años los ECN comenzaron a reportarse como agentes causales de infecciones, aislándolos de septicemias, casos de endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, entre otros sitios. Alrededor de los años 1960 y 1980 se pensaba que este grupo de microorganismos solo eran contaminantes de los sitios de infección y que *S. aureus* era el único patógeno dentro del género *Staphylococcus*; sin embargo, conforme pasaban los años las técnicas de identificación comenzaban a tener mayor eficacia y esto potenciaba la credibilidad de los ECN como los agentes etiológicos (Becker *et al.* 2014).

Para la década de 1980 la gama de infecciones que se creía causada por ECN, especialmente por *S. epidermidis*, era bastante amplia destacando los casos de bacteriemias, endocarditis e infecciones asociadas a dispositivos invasivos (Kloos *et al.* 1994).

Dentro de las especies con mayor relevancia clínica de los ECN se encuentra *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* los cuales son aislados con mayor frecuencia de especímenes clínicos en alrededor del 80% de los casos y el resto de las especies corresponden a *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. aeroliticus*, entre otros (Becker *et al.* 2014; Fariña *et al.* 2013). Debido a que *S. epidermidis* es el agente causal predominante, este se ha tomado como un microorganismo modelo de los ECN, dejando un amplio campo de estudio a las otras especies de este grupo que son menos frecuentes.

S. hominis fue descrito por primera vez en 1975 por Kloss y Schleifer, como una nueva especie que coloniza la piel de humanos sanos, resultados obtenidos de su trabajo sobre caracterización del microbioma de la piel (Kloos y Schleifer 1975). Más tarde en 1998 se describió una subespecie denominada *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, aislada de bacteriemias, donde se observó resistencia a novobiocina y la incapacidad de producir ácido a partir de D-trehalosa y N-acetil-D-glucosamina y con un perfil de multifármaco resistencia. Con este nuevo reporte, las especies sensibles a novobiosina se denominaron *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* (Kloos *et al.* 1998).

La hospitalización prologada es el factor de riesgo más importante para predisponer al paciente a infecciones por ECN, el uso de dispositivos médicos que requieran sobrepasar la piel como el uso de agujas, catéteres intravenosos, así como también ciertos implantes, por ejemplo: marcapasos o algunos tipos de prótesis. Adicionalmente, presentan mayor riesgo de infección por ECN los pacientes con el sistema inmune comprometido como los neonatos, las personas de la tercera edad, pacientes con cáncer o personas infectadas con VIH u otras enfermedades relacionadas que comprometan el sistema inmune, así como pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos. Actualmente *S. hominis* se ha reportado como uno de los tres principales agentes causales de bacteriemias, entre otras infecciones asociadas a la atención de la salud (Casey *et al.* 2007).

2.4 Aislamiento e identificación

El primer problema que se tiene al momento de determinar el agente causal en una infección por ECN, radica en diferenciar correctamente entre las especies de este grupo. Los estafilococos no requieren de medios especiales para su aislamiento, crecen muy bien en medios nutritivos simples, o medios enriquecidos como el agar sangre. También se pueden utilizar medios adicionados con NaCl, ya que la mayoría de las especies son tolerantes. El un esquema de identificación de rutina básico consiste en pruebas basadas en el metabolismo como la actividad de catalasa, coagulasa, hemólisis, producción de ácido a partir de diversos carbohidratos y la reducción de nitrato (Kloos 1975; Becker *et al.* 2014; Frank *et al.* 2008).

Actualmente, los métodos fenotípicos de identificación de ECN incluyen sistemas comerciales basados en una amplia batería de pruebas bioquímicas en modalidad semiautomatizada o automatizada. Este tipo de métodos de identificación son los más utilizados como pruebas de rutina en laboratorios clínicos, de los cuales se encuentran con frecuencia los sistemas como API® Staph, API® ID32 Staph (bioMérieux), VITEK® 2 (bioMerieux), RapiDEC® Staph (bioMérieux), Crystal™ Identification System (BD Biosciences) entre muchos otros (Chen *et al.* 2006; Winn *et al.* 2006). Estos fueron probados y se tienen reportes de un alto porcentaje de discriminación entre las especies de ECN más frecuentes, particularmente destacan los

sistemas de API® comparados con otros métodos (Cunha *et al.* 2004; Layer *et al.* 2006). Sin embargo, estos métodos fenotípicos no permiten la identificación a nivel especie de todo el grupo de los ECN y algunas de estas son identificadas erróneamente o se tiene una baja especificidad.

El desarrollo y uso de métodos moleculares y proteómicos permiten una mayor discriminación entre especies y resuelve gran parte del problema atribuido a la alta similitud en la asimilación de carbohidratos y otros compuestos. De los métodos moleculares utilizados con frecuencia se destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual muestran buena discriminación al diferenciar especies en comparación de los métodos fenotípicos. Los genes objetivos de estos métodos comúnmente utilizados para ECN comprenden genes ribosomales 16S y 23S, *gap*, *gyrA*, *rpoB*, *tuf*, *sodA*. (Heikens *et al.* 2005, Martineau *et al.* 2001). Cabe destacar que la validez de los resultados va a depender en gran medida de la calidad de la base de datos para el análisis de la secuencia (Becker *et al.* 2004).

En años recientes los métodos ya mencionados van en desuso en algunos laboratorios, debido a la introducción de un sistema de identificación por espectrometría de masas, principalmente con el uso de la técnica de desorción/ionización por láser asistida en matriz acoplada a un analizador con tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). Este equipo se emplea cada vez con mayor frecuencia para la identificación de numerosos patógenos incluyendo a los del género de los estafilococos (Zhu *et al.* 2015; Argemi *et al.* 2015). La forma de identificación por este método está basada en el espectro peptídico obtenido por la determinación del peso molecular de fragmentos específicos individuales, para lograrlo los compuestos químicos son ionizados en moléculas cargadas donde la tasa de masa/carga (m/z) es medida (Singhal *et al.* 2015).

Los problemas de identificación a nivel especie entre los ECN debido a la gran similitud tanto genética como fenotípica, con este tipo de tecnología abre gran camino para poder hacer esta discriminación entre especies, además de contar con muchas ventajas ya que es más rápido, sensible y económico en comparación de los métodos mencionados anteriormente, donde utilizan muchos insumos, reactivos, requieren de

mucho tiempo y suelen ser más costosos (Singhal *et al.* 2015). Se ha comparado la eficacia que tiene MALDI-TOF contra otros sistemas, por ejemplo: VITEK, para la identificación de ECN, con eficacia del 100% contra un 88%, respectivamente. Los resultados fueron corroborados con el análisis de ARNr 16S (Delpont 2015). Otro reporte corrobora la eficacia del MALDI-TOF en la identificación de ECN, donde se identificó el 99.3% a nivel especie (Dubois *et al.* 2010).

Los métodos rutinarios que se utilizaban en un principio no tenían suficiente especificidad para *S. hominis*, dependiendo del método utilizado en general se tenía <85%, y con frecuencia era erróneamente identificado, por lo cual recurrió a análisis genéticos para su identificación (Alexopoulou *et al.* 2006). La introducción de MALDI-TOF en el área clínica ha aumentado la especificidad entre las especies de ECN, incluido *S. hominis*, donde se identifican el 100% de los aislamientos sin dificultad. (Delpont 2015; Dupont *et al.* 2010). En los últimos años se ha incrementado el número los reportes de *S. hominis* a partir de especímenes clínicos (Voineagu *et al.* 2012; Szczuka *et al.* 2014; 2016).

2.5 Patogenicidad y factores de virulencia

Los ECN tienen capacidad de producir una infección debido a que cuentan con estrategias específicas para poder pasar las barreras protectoras naturales del cuerpo, y así poder iniciar el proceso de adhesión como paso inicial de la infección. Debido a que este grupo de microorganismos son comensales en piel, cualquier daño sobre esta es una ventaja que constituye una vía de entrada, y una vez que atraviesan la piel, las células bacterianas evaden la respuesta inmunológica debilitada y se inicia el proceso de adhesión, colonización e invasión. La colonización puede iniciarse al momento de insertar en el paciente algún tipo de equipo médico como agujas, o catéteres introduciendo una pequeña cantidad de bacterias de las membranas mucosas o piel del paciente. En comparación con *S. aureus* los factores de virulencia son menos conocidos y solamente los agentes etiológicos de ECN más comunes como *S. epidermidis* están mejor caracterizados; sin embargo, con el aumento en la frecuencia de las demás especies causantes de infección, su estudio es de mayor necesidad y gran importancia.

2.5.1 Formación de biofilm

Todos los factores de virulencia son importantes al momento de causar la infección. Sin embargo, hay unos que son críticos o de mayor relevancia debido a las dificultades que se tienen al momento de administrar un tratamiento al paciente. El evento crítico para comenzar la colonización o infección es la adherencia al hospedador o a la superficie de dispositivos médicos, comúnmente asociada a catéteres. Esta adhesión es llevada a cabo por la formación de biopelícula o biofilm. Existe variación y falta de resultados concluyentes entre los reportes sobre el biofilm de *S. hominis*. En un principio se pensaba que era una bacteria no formadora de biofilm, esta perspectiva cambió cuando se empezó a reportar su capacidad, donde más de la mitad de los aislamientos muestran producción, incluso se han reportado aislamientos con altos niveles de biofilm (Szczuka *et al.* 2015).

La formación del biofilm puede ser dividida en cuatro grandes pasos, de manera resumida. El primero, la bacteria se une rápidamente a la superficie biótica o abiótica; segundo, la bacteria empieza a multiplicarse y acumularse en la matriz de agregados celulares, un proceso que requiere adhesión intracelular; en el tercer paso, crece y madura, en esta fase el biofilm cuenta con canales para el intercambio de oxígeno y nutrientes; en el cuarto y último paso, las células individuales o pequeños agregados se desprenden de la matriz y se diseminan a través del torrente sanguíneo para empezar la colonización y la nueva formación de biofilm en otro sitio (Ceri *et al.* 2001; Costerton *et al.* 1999).

Dentro del biofilm un gran número de bacterias están aglomeradas y encapsuladas dentro de una matriz extracelular, compuesta de productos secretados por la bacteria. Estos son muy diversos entre los cuales se pueden mencionar: ácidos teicoicos, proteínas, polisacáridos y ADN extracelular (ADNe) (Becker *et al.* 2014). No todas las especies de los ECN presentan el mismo patrón de composición del biofilm, incluso en la mayoría de las especies aún no está caracterizado, o aún falta información al respecto.

El componente principal en la mayoría de los biofilm está formado por una matriz de polisacáridos de entre los cuales el mayor componente es poli- β -N-acetilglucosamina

(PNAG) el cual es encontrado en el biofilm formado por *S. aureus* y *S. epidermidis* (Maira *et al.* 2002). Por el contrario, se ha encontrado que los carbohidratos no son el único componente del biofilm y que este se puede encontrar en menor proporción en otras especies de ECN. Por ejemplo, el biofilm, en *S. lugdunensis* se ha encontrado que el PNAG no es el componente principal. En un estudio realizado por Frank y colaboradores en el 2007 mediante la tinción del componente extracelular dirigido a los distintas componentes, así como la utilización de reactivos que degradan a los mismos, encontraron que está compuesto principalmente de proteínas (Frank *et al.* 2007). El biofilm producido por *S. hominis* muestra una composición heterogénea, principalmente de carbohidratos y proteínas, aunque se ha reportado que la composición es dependiente de la cepa, teniendo aislamientos con mayor proporción de proteínas en su composición (Szczuka *et al.* 2014; Mendoza *et al.* 2015).

2.5.2 Genes asociados a la formación de biofilm

Se ha determinado que el locus *icaADBC* presente en *S. aureus* y *S. epidermidis*, codifica la producción de PNAG, también conocida como adhesina intracelular de polisacárido (PIA, por sus siglas en inglés); el cual, como se mencionó anteriormente, es el componente principal de biofilm (Li *et al.* 2005). En un estudio realizado por Frank y colaboradores encontraron que todos los aislamientos de *S. lugdunensis* contenían una región homóloga al locus *icaADBC* y a pesar de que estaba presente, el PNAG no era parte de la matriz compuesta del biofilm (Frank *et al.* 2007).

Genes que pertenecen al locus *icaADBC*, (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* e *icaR*) se han detectado en distintas especies de ECN, incluso se han detectado estos genes *en* aislamientos clínicos de *S. hominis*. Aunque la correlación entre la producción de biofilm y la presencia de alguno de estos genes, aún no está bien definida (Mendoza *et al.* 2015; Nasr *et al.* 2012).

2.5.3 Métodos de estudio del biofilm

Gran número de microorganismos son capaces de formar biofilm, en bacterias se conocen productores de biofilm tanto Gram positivas como Gram negativas. Debido al gran número de microorganismos formadores de biofilm se han desarrollado distintas

técnicas para su estudio. Dentro de las técnicas se incluyen: espectrofotometría por cultivo en placa, crecimiento en tubo, agar rojo Congo, ensayos bioluminiscentes, ensayos fluorescentes mediante microscopía, etc. (Deka 2014).

El método más utilizado es mediante métodos espectrofotométricos, el cual consiste en adicionar un cultivo joven en caldo soya tripticaseína con la adición de 1% de glucosa a una microplaca de poliestireno, en la cual la bacteria formara el biofilm adhiriéndose a las paredes internas de cada pocillo, las células adheridas son teñidas con cristal violeta y después el colorante adherido se disolverá para después ser medida la densidad óptica. Este método fue propuesto por Christensen hace 35 años y con algunas variantes continua vigente (Christensen *et al.* 1985).

Se ha realizado la comparación de estos métodos entre sí, y se ha reportado que la tinción en placa es el método más adecuado para la detección del biofilm (Deka 2014; Panda *et al.* 2016). La microscopía de láser confocal es una técnica muy utilizada en el estudio del biofilm, ya que no es invasiva y muestra la estructura tridimensional del biofilm permitiendo el análisis de varios parámetros referente al biofilm (área, grosor, rugosidad, etc.); sin embargo, su principal desventaja es que es una técnica costosa que además requiere de infraestructura especial y personal altamente capacitado (Tolker y Sternberg 2014).

Actualmente, se buscan nuevas formas para la detección rápida de producción del biofilm, una de ellas es la búsqueda marcadores moleculares. Una buena y muy prometedora opción es la búsqueda de marcadores proteicos mediante el uso de MALDI-TOF, utilizando los espectros obtenidos de la identificación bacteriana y en conjunto con programas especializados como ClinProTools, que hacen la comparación entre los espectros de un grupo definido, y muestra las diferencias entre los picos del espectro de las proteínas (Ketterlinus *et al.* 2005). Este conjunto es una herramienta en estudio donde se han reportado potenciales biomarcadores, por ejemplo: para la diferenciación de especies entre *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, mejorando significativamente la identificación (Chen *et al.* 2015). También se ha utilizado para clasificar a *Mycoplasma pneumoniae* entre tipo 1 y tipo 2, donde se obtuvo resultados exitosos con un 100% de sensibilidad y especificidad (Xiao *et al.*

2014). No se han realizado estudios en *S. hominis* en donde se comparen los espectros entre los aislamientos no productores y los productores de biofilm.

2.5.4 Resistencia a antibióticos

Una vez producida la infección en el hospedador, otro punto clave y factor de virulencia importante para el tratamiento, es la susceptibilidad a los antibióticos. Durante la última década se ha dado pérdida en la susceptibilidad dentro de los ECN, se ha visto un alto incremento en el porcentaje de cepas resistentes especialmente a la penicilina, oxacilina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina y gentamicina (Becker *et al.* 2014).

El patógeno más importante dentro del género *Staphylococcus* es *S. aureus* especialmente las cepas que son resistentes a la meticilina, una penicilina semisintética que fue introducida en los años 1960 para contrarrestar a *S. aureus* resistentes a penicilinas en los hospitales, sin embargo poco después de su introducción fue detectada resistencia por parte de este patógeno, cepas denominadas SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), o MRSA por sus siglas en inglés (Jevons *et al.* 1961; Cetin *et al.* 1962). Se han reportado a otras especies de ECN resistentes a meticilina, es el caso de *S. epidermidis* y *S. hominis*, con una frecuencia cerca del 80% de resistencia a meticilina (Barbier *et al.* 2010).

La característica principal de la resistencia a meticilina es la resistencia cruzada con todos los antibióticos β -lactámicos (Raad *et al.* 1998). Esta resistencia es dada por una proteína de unión a penicilinas alternativa, denominada PBP2' (penicillin binding protein), la cual es codificada por el gen *mecA*, el cual es parte de un elemento móvil denominado SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) (Chah *et al.* 2014; Katayama *et al.* 2000).

Se ha encontrado la presencia del gen *mecA* o análogos en ECN, con resistencia a β -lactámicos especialmente meticilina, aunque cabe destacar que también no se mostró la presencia de este gen y aun así contaban con la resistencia (Ugwu *et al.* 2015). En *S. hominis* se ha detectado la presencia de distintos tipos de SCC*mec*, incluso un nuevo tipo de casete. Además de aislamientos clínicos con la presencia de *mecA* en >80% del total recuperados (Mendoza *et al.* 2015; Barbier *et al.* 2010; Bouchami *et al.* 2011).

El linezolid es miembro de las oxazolidinonas, el cual es activo contra cepas MRSA y MSSA (cepas sensibles a meticilina), inhibe la síntesis de proteínas bloqueando la formación del complejo ribosomal. Este mecanismo de acción es diferente a otros inhibidores de síntesis proteica. Su uso es de los últimos en elegir al momento de darlo como tratamiento ya que su toxicidad es muy alta, aunque es aprobado por la FDA (Tsiodras *et al.* 2001). En los últimos años se ha visto resistencia a este antibiótico, en aislados de ECN, incluyendo a *S. hominis*. Aunque los reportes son aislados, son de mucha importancia para su vigilancia (Enrique *et al.* 2011; Balandin *et al.* 2016).

Se ha asociado el incremento de la resistencia a antibióticos a la formación de biofilm, la cual puede aumentar hasta 1000 veces en las células que se encuentran inmersas en la matriz reside en la naturaleza de la estructura del biofilm, conferida por los distintos polímeros. El resultado es la incapacidad del antibiótico en penetrar a todas las áreas del biofilm y destruir adecuadamente las células bacterianas (Andersson y Hughes 2014).

La capacidad de un antibiótico para atravesar el biofilm, depende de la bacteria que lo produce y las características estructurales del mismo, dadas por su composición, así sean carbohidratos, proteínas, ADN extracelular o lípidos, incluso una combinación de estos. Además, depende el tipo de antibiótico basado en su tamaño y estructura. Debido a esto, es común que las bacterias que se encuentran en la base del biofilm estén expuestas a concentraciones subinhibitorias del antibiótico que no son capaces de eliminar a la bacteria, pero pueden afectarla. Existen reportes donde se demuestra que concentraciones subinhibitorias modifican la expresión de genes de virulencia de *Staphylococcus aureus*, como las toxinas, las enzimas, las proteínas reguladoras, la adhesión, entre otras (Otto *et al.* 2013; Smith *et al.* 2010). Sin embargo, poco se sabe del efecto que se tiene sobre la formación de biofilm de *S. hominis*.

3. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus hominis se aísla cada vez con mayor frecuencia como agente causal de infecciones asociadas a la atención de la salud y actualmente es uno de los tres microorganismos principales causantes de bacteriemias.

La formación de biofilm es el principal factor de virulencia en *S. hominis*, el cual se asocia a la adherencia a dispositivos médicos y al aumento en la resistencia a los antibióticos. Uno de los factores que se le atribuye el incremento de la farmacorresistencia es que, dentro del biofilm las células bacterianas están en contacto con concentraciones subinhibitorias de antibióticos. Las infecciones causadas por cepas productoras de biofilm y farmacorresistentes complican el tratamiento e incrementan la tasa de mortalidad en estas infecciones.

No existen datos concluyentes sobre la relación del biofilm de *S. hominis* y el aumento en la farmacorresistencia, así como el efecto en la composición con concentraciones subinhibitorias de antibióticos. No se han reportado estudios sobre marcadores proteicos de virulencia o resistencia a los antibióticos en *S. hominis* utilizando espectrometría de masas.

4. HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos de *S. hominis* producen biofilm lo cual causa un incremento en la farmacorresistencia y concentraciones subinhibitorias de antibioticos modifican el biofilm, esto contribuye a una mayor resistencia a los antibióticos y la combinación de estos factores da lugar a cepas más virulentas. El análisis de la composición proteica generará información sobre posibles marcadores de virulencia y/o resistencia a los antibióticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar asociación de la producción y composición del biofilm con la farmacorresistencia y perfil proteico en aislamientos clínicos de *Staphylococcus hominis*.

5.1.2 Objetivos específicos

1. Identificar y seleccionar los aislamientos clínicos de *S. hominis*
2. Evaluar el nivel de producción de biofilm.
3. Determinar la composición del biofilm con y sin concentraciones subinhibitorias de antibióticos.
4. Determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células platónicas y de biofilm.
5. Determinar la presencia del gen *mecA*
6. Comparar los perfiles proteicos en busca de marcadores de virulencia y resistencia a los antibióticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Selección de los aislamientos

Se incluyeron 341 aislamientos clínicos de Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) recuperados en el periodo del año 2006 al 2016, los cuales se encontraban conservados en tubos crioviales con caldo *Brucella* con 15% de glicerol a -80 °C. Los aislamientos incluidos fueron recuperados de pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL y del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.

6.1.2 Criterios de inclusión y exclusión

Se tomaron en cuenta todos aquellos aislamientos clasificados como ECN y se descartaron aquellos aislamientos identificados como *Staphylococcus epidermidis*, *Saphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus saprophyticus*. Se seleccionaron los aislamientos provenientes de sangre, de acuerdo con los criterios propuestos por la norma oficial mexicana: NOM-045-SSA2-2005. Además, se incluyeron otros especímenes clínicos como líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico. Se descartaron aquellos especímenes que pudieran tratarse de una contaminación como en el caso de heridas, biopsias superficiales, etc.

6.2 Reactivación metabólica

Se recolectaron 341 aislamientos que cumplieron con los criterios. Cada aislamiento se inoculó en agar sangre (Becton Dickinson, GmbH, Heidelberg, Alemania) y se incubó a 35 °C durante 24 h. Se verificó la pureza del cultivo. De los cultivos contaminados se tomó una colonia aislada y se resembró en agar sangre hasta la obtención del cultivo puro. Los aislamientos se conservaron en tubos crioviales con agar soya tripticasa entre 3-5 °C hasta su uso.

6.3 Identificación nivel especie: MALDI-TOF

Se realizó la identificación a nivel especie a través de la desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo: MALDI-TOF, por sus siglas en inglés (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania). Se tomó como una identificación confiable de género y especie un score ≥ 2.0 , el score ente 1.5 – 2.0 se tomó como una identificación segura de género, pero probable de especie y un score ≤ 1.5 como una identificación no confiable.

6.3.1 Método directo

A partir de un cultivo joven de 24 h de incubación en agar sangre se tomaron de 1-2 colonias aisladas y se transfirieron con un aplicador de madera a la placa del equipo de 96 pocillos de acero inoxidable. Cada aislamiento se colocó en cada uno de los pocillos. Posteriormente se añadió 1 μ l de ácido fórmico al 70% (v/v) a cada pocillo para facilitar la extracción proteica y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Seguido se adicionó 1 μ l de la matriz HCCA (ácido 4-bromo- α -cianocinámico), y de igual manera se dejó secar por completo. Se utilizó como control un extracto proteico de *Escherichia coli* DH5 α . La placa se introdujo en el equipo, se controló mediante el software flexControl 3.4 y se analizó mediante el software MALDI biotyper 4.0 comparando los espectros de proteínas de los aislamientos con la base de datos del equipo.

6.3.2 Extracción en tubo

Los aislamientos que obtuvieron un score < 2.00 sin obtener identificación confiable, se les realizó la extracción de proteínas en tubo. Para esto transfirieron de 1 a 3 colonias a partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre a un tubo Eppendorf con 300 μ l de agua destilada y se adicionaron 900 μ l de etanol, se homogenizó en vortex durante 30 s. La suspensión se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 2 min, posteriormente se decantó el etanol y se eliminó el exceso con una micropipeta y se dejó secar por completo a temperatura ambiente. Seguido, al precipitado se le añadieron 50 μ l de ácido fórmico al 70% (v/v), se homogenizó en vortex durante 30 s y se dejó incubar durante 5 minutos. Después se le añadieron 50 μ l de acetonitrilo al 100 %, se dio vortex durante 30 s y se centrifugó a 13000 r.p.m durante 2 minutos. Se tomó 1 μ l del sobrenadante y

se colocó en la placa del equipo, se dejó secar y se le añadió 1 µl de la matriz y se dejó secar por completo. Posteriormente se analizó en el equipo.

6.4 Nivel de producción de biofilm

Se determinó de forma semicuantitativa mediante la tinción con cristal violeta (Christensen *et al.* 1985).

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se transfirió una colonia a caldo soya tripticasa y se incubó a 35 °C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se realizó una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticasa suplementado con 1% de glucosa. De esta dilución se transfirieron 200 µl y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Corning® Costar®, NY, USA). Se realizaron 4 repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control con medio sin inocular. La placa se incubó a 35 °C por 24 h.

Después de la incubación se determinó la densidad óptica (DO) de las células plantónicas, para esto se transfirió 100 µl de uno de los cuatro pocillos de cada aislamiento, se homogenizó sin tocar las paredes internas del pocillo, a otra microplaca estéril la cual se midió la DO en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) a 595 nm.

Para determinar la densidad óptica de la biopelícula se descartó el medio de cultivo sobrenadante de la microplaca y se invirtió sobre papel secante dando unos golpes para eliminar el exceso de líquido. Posteriormente se realizó la fijación del biofilm adicionando 200 µl de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, posteriormente se descartó el metanol y se retiró el exceso de líquido. Seguido se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y quitando el exceso de agua. Después de le añadió 200 µl de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 µl de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente con la finalidad de disolver el biofilm. Se realizó la lectura de la densidad óptica en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) a 595 nm. El criterio de evaluación se

llevó a cabo mediante los siguientes rangos de clasificación, una DO < 0.120 se consideró no productor, en el rango 0.120 a 0.240 como productor débil, y DO >0.240 como productor fuerte.

6.5 Composición del biofilm

Se realizaron ensayos de desprendimiento de biofilm a los aislamientos productores de biofilm (n=115), utilizando distintos sustratos que degradan específicamente cada uno los componentes de la matriz extracelular (carbohidratos, proteínas y ADN). Se utilizaron concentraciones subinhibitorias de linezolid y vancomicina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y se observó su efecto en la composición del biofilm.

6.5.1 Composición del biofilm sin antibióticos

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se transfirió una colonia a caldo soya tripticasa y se incubó a 35 °C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se realizó una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticasa suplementado con 1% (p/v) de glucosa. De esta dilución se transfirieron 200 µl y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos donde se realizaron 4 repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control con medio sin inocular. Este procedimiento se realizó por cuádruple (una como control, una para carbohidratos, una para proteínas y una última para ADN) Las cuatro placas contenían los mismos aislamientos. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

El medio sobrenadante se descartó y se eliminó el exceso de líquido invirtiendo las placas y dando ligeros golpes sobre papel absorbente. Se realizó la fijación del biofilm adicionando 200 µl de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, posteriormente se descartó el metanol y se retiró el exceso de líquido. Seguido se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para cada placa y se retiró el exceso de agua y se dejaron seca por completo a temperatura ambiente. Una vez secas se le añadió a cada placa 200 µl a cada pocillo con el sustrato correspondiente: a) 40 mM de NaIO₄ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en agua bidestilada, b) 0.1 mg/ml de proteinasa K (Bioline, Londres, UK) en 20 mM Tris-HCl a pH: 7.5 con 100 mM NaCl y c) 0.5 mg/ml DNasa (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) I en 5 mM MgCl₂. Se dejó una placa control sin

la adición de sustrato, así como un pocillo como control de esterilidad y como blanco espectrofotométrico, las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 h. La placa con la adición de NaIO₄ se cubrió de la luz con papel aluminio para evitar la degradación del sustrato por efecto de la misma.

Transcurridas las 24 h se descartaron los sustratos de cada placa y se realizaron 3 lavados a cada placa con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua. Después de le añadió 200 µl de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos de las cuatro placas y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 µl de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la densidad óptica en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) a 595 nm.

El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control. El criterio de evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera: <10% sin desprendimiento, de 10 a 50% desprendimiento intermedio, de 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y >75% desprendimiento fuerte. Los porcentajes más altos de desprendimiento se interpretaron como la composición de mayor abundancia de biofilm (Mendoza *et al.* 2015).

6.5.2 Composición del biofilm con antibióticos

Se realizó una selección representativa de los aislamientos productores de biofilm (n=43) para determinar el efecto en la composición de concentraciones subinhibitorias de antibióticos. A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se transfirió una colonia a caldo soya tripticasa y se incubó a 35 °C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se realizó una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticasa suplementado con 1% (p/v) de glucosa, adicionalmente se añadió una concentración subinhibitoria de linezolid (0.06 µg/ml) y se repitió el mismo proceso para vancomicina (0.03 µg/ml). De esta dilución ya con la adición del antibiótico, se transfirieron 200 µl y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos donde se realizaron 4 repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control con medio sin

inocular. Este procedimiento se realizó por cuádruple para cada antibiótico (un control, una para carbohidratos, una para proteínas y una última para ADN). Todas las placas contenían los mismos aislamientos y se incubaron a 35 °C por 24 h.

El medio sobrenadante se descartó y se eliminó el exceso de líquido invirtiendo las placas y dando ligeros golpes sobre papel absorbente. Se realizó la fijación del biofilm adicionando 200 µl de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, posteriormente se descartó el metanol y se retiró el exceso de líquido. Seguido se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para cada placa y se retiró el exceso de agua y se dejaron secar por completo a temperatura ambiente. Una vez secas se le añadió a cada placa 200 µl a cada pocillo con el sustrato correspondiente: a) 40 mM de NaIO₄ en agua bidestilada, b) 0.1 mg/ml de proteinasa K en 20 mM Tris-HCl a pH: 7.5 con 100 mM NaCl y c) 0.5 mg/ml DNasa I en 5 mM MgCl₂. Se dejó una placa control para cada antibiótico sin la adición de sustrato, así como un pocillo en cada placa como control de esterilidad y como blanco espectrofotométrico, las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 h. La placa con la adición de NaIO₄ cubrió de la luz con papel aluminio para evitar la degradación del sustrato por efecto de la misma.

Transcurridas las 24 h se descartaron los sustratos y se realizaron 3 lavados a cada placa con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua. Después de le añadió 200 µl de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos de las placas y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 µl de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la densidad óptica en un lector de microplacas a 595 nm.

El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control. El criterio de evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera: <10% sin desprendimiento, de 10 a 50% desprendimiento intermedio, de 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y >75% desprendimiento fuerte. Los porcentajes más altos de desprendimiento se interpretaron como la composición de mayor abundancia de biofilm (Mendoza *et al.* 2015).

6.6 Perfil de susceptibilidad a antibióticos

Se llevó a cabo mediante los métodos y criterios descritos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), en el documento M-100 (CLSI, 2017) y M07-A10 (CLSI 2015). Se seleccionaron 12 antibióticos correspondientes a los siguientes grupos de antibióticos: penicilinas (oxacilina), glicopeptidos (vancomicina), aminoglucósidos (gentamicina), macrólidos (azitromicina y eritromicina), tetraciclinas (tetraciclina), fluroquinolonas (ciprofloxacino), lincosamidas (clindamicina), inhibidores de folato (trimetroprima-quinupristina), fenicoles (cloranfenicol), ansamicinas (rifampicina) y oxazolidinonas (linezolid). Se tomó en cuenta al menos un antibiótico de los grupos de mayor relevancia para *Staphylococcus* spp. que se menciona en el documento M100 2017 (CLSI, 2017).

La metodología empleada para la susceptibilidad en células de biofilm se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del material para determinar la concentración mínima de erradicación del biofilm (CMEB™, Innovotech, AB, Canadá).

6.6.1 Preparación de las soluciones stock de los antibióticos

Se prepararon soluciones stock a una concentración de 1 mg/ml de todos los antibióticos. Se pesó 1 mg de la presentación en polvo de cada antibiótico (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y se diluyó en 1 ml del diluyente correspondiente a cada uno descrito en el manual de procedimientos del CLSI en el documento M-100, 2017. Las soluciones stock se conservaron en congelación en tubos Eppendorf a -80 °C hasta su uso.

6.6.2 Preparación del panel de antibióticos

Se prepararon las soluciones de trabajo tomando en cuenta dos diluciones por encima del punto de corte de resistencia (células planctónicas) de cada antibiótico mencionado en el documento M-100 del CLSI y se tomaron en cuenta al menos dos diluciones por encima y debajo del rango para las células de biofilm. Se realizaron los cálculos correspondientes para cada antibiótico y se diluyó la solución stock en caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. En el caso de oxacilina se diluyó en caldo Müeller-Hinton con cationes ajustados de NaCl 1% (p/v) A partir de la dilución de trabajo se tomaron 200 µl de cada antibiótico y se colocaron cada uno en la primera fila de una

microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo curvo. En las filas restantes se adicionaron 100 µl de caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. Las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 µl de la solución de trabajo que anteriormente se había colocado en la microplaca. (de la fila 1 a la 2, 2 a 3, 3 a 4, etc.), homogenizando entre cada pase. Se dejaron dos pocillos como control negativo y positivo. Los paneles de antibióticos se guardaron en congelación a -80 °C hasta su uso.

6.6.3 Células planctónicas

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar Müeller-Hinton se realizó la preparación de los inóculos de cada aislamiento por suspensión de 3-5 colonias en tubos con solución salina estéril al 0.85% (p/v) ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (0.08-0.13 absorbancia a 525 nm). A partir del inóculo, este se diluyó a razón 1:150 en caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. Seguido se tomaron 100 µl y se transfirieron a cada pocillo del panel de antibióticos dejando un pocillo sin inocular como control negativo. Las placas se incubaron a 35 °C por 18-24 h tratando de no apilar más de 4 cajas, para evitar diferencia en la temperatura. Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración de antibiótico en la cual a simple vista no se aprecia crecimiento.

6.6.4 Células de biofilm

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se realizó la preparación de los inóculos de cada aislamiento por suspensión de 3-5 colonias en tubos con solución salina estéril al 0.85% (p/v) ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (0.08-0.13 absorbancia a 525 nm). A partir del inóculo, este se diluyó a razón 1:50 en caldo soya tripticasa adicionado con 1% (p/v) de glucosa. Seguido se tomaron 150 µl y se añadieron a cada pocillo de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano y se colocó la tapa del dispositivo de Clagary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá) quedando las clavijas inmersas en el medio. Se incubó a 35 °C por 24 h sobre un agitador a 150 r.p.m.

Posterior a la incubación las clavijas se enjuagaron dos veces con PBS para eliminar las células no adheridas y se dejaron secar a temperatura ambiente. La tapa se transfirió al panel de antibióticos preparado anteriormente y se incubaron las placas a 35

°C por 18-24 h. Posteriormente se retiró a la tapa del panel de antibióticos y se enjuagaron las clavijas dos veces con buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.3 y se transfirió la tapa a una microplaca estéril conteniendo 200 µl en cada pocillo caldo Müeller-Hinton, la cual se sónico 10 min en un ultrasonificador (Branson 5800, Danbury, USA), después se retiró la tapa con las clavijas y se cambió a una tapa normal. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Posterior a la incubación se determinó la Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB) como la concentración mínima de antimicrobiano que a simple vista no presenta crecimiento y erradica la biopelícula.

6.6.5 Detección del gen *mecA*

Se realizó la extracción de ADN mediante lisis térmica, para esto se tomaron de 5 a 8 colonias a partir de un cultivo joven de 24 h en agar sangre y se suspendieron en 50 µl de agua destilada ultra pura contenida en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se colocaron en un bloque de calentamiento (AccuBlock™, Labnet International, Inc, NJ, USA) a 100 °C durante 5 min. Posteriormente se centrifugó la suspensión a 13 000 r.p.m. durante 5 min. El sobrenadante que contenía el ADN se transfirió a tubos Eppendorf de 0.5 ml y se guardaron en congelación a -18 °C por un tiempo máximo de 7 días.

Para la PCR punto final se realizó una mezcla de reacción compuesta por 1X del buffer de reacción (Bioline, Londres, UK) NH₄ pH 8.8, MgCl₂ (Bioline, Londres, UK) 2.5 mM, dNTP's 0.8 mM, 1U Taq ADN polimerasa y los iniciadores MecA147- Forward y MecA147- reverse (Eurofins, AL, USA) 0.046 µM que dan como resultado un producto de PCR de alrededor de 147 pb.

Para una reacción se añadieron las siguientes cantidades: 0.5 µl de dNTP's, 5 µl del buffer de reacción, 1.75 µl de MgCl₂, 0.35 µl de cada uno de los iniciadores MecA147-F y MecA147-R, 13.05 µl de H₂O ultra pura y 1.5 µl de Taq polimerasa. A esta mezcla se le añadieron 5 µl de ADN obteniendo un volumen final de 25 µl para cada tubo.

La PCR se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones de amplificación: para la desnaturalización inicial 1 ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos, para la desnaturalización 1 min a 94 °C, alineamiento 1 min 50 °C y elongación 2 min a 72 °C, y por último un ciclo para la elongación final por 10 min a 72 °C.

La verificación del producto de PCR se llevó a cabo mediante una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2% a la cual se le agregó bromuro de etidio a una concentración de 2 µl/ml. Se utilizó un marcador de peso molecular 100 – 3000 pb (Axygen®, Corning, USA). El gel se sometió a 100 V durante 45 min en una cámara de electroforesis (Mini-Sub cell GT, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) con buffer tris-borato-EDTA (TBE) 0.5 X.

El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm empleando un fotodocumentador UVP Bioluming Systems, y se empleó el software Labworks45™ para la obtención de las imágenes en formato digital.

6.7 Análisis mediante ClinProTools

Los espectros obtenidos de los aislamientos identificados por MALDI-TOF fueron clasificados en dos grupos: 1: nivel de producción de biofilm y el 2: en base a la presencia del gen *mecA*. Los espectros fueron añadidos al software ClinProTools 2.2 (Bruker Daltonics).

El software utiliza un esquema de trabajo en donde se incluye la recalibración, y la selección automática de los picos encontrados en los espectros. Se seleccionaron los picos en el rango de 2000 a 10000 (m/z). Los valores de m/z del espectro promedio de cada grupo fueron obtenidos y se identificaron los picos de acuerdo con su significancia estadística determinada por las diferentes pruebas que realiza el software. Prueba de Anderson-Darling(AD), análisis de varianza ANOVA con la prueba t-student (t-ANOVA) y la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis (W/KW). La significancia entre cada pico fue tomada en cuenta de acuerdo con el valor p como se indica en la siguiente tabla.

	Prueba t- ANOVA P≤0.05	Prueba t -ANOVA p> 0,05	W/KW P≤0.05	W/KW p> 0.05
AD p>0.05	Interés	No interés	Interés	No interés
AD p≤0.05	-	-	Interés	No interés

Se obtuvieron los gráficos de cada pico de interés y se seleccionó al azar un pico representativo para su visualización.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación

Se incluyeron 341 aislamientos provenientes de especímenes clínicos, principalmente de sangre (77.18%); identificados previamente como ECN. La identificación a nivel especie fue confirmada a través de la desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). Los resultados de la identificación confirmada por MALDI-TOF se muestran en la tabla 1. *S. hominis* fue la especie más frecuente con un 43.4% (148/341), seguido por *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*.

Tabla 1. Porcentaje de los aislamientos de ECN identificados mediante MALDI-TOF

Identificación	n.º de aislamientos	Porcentaje (%)
<i>S. hominis</i>	148	43.40
<i>S. epidermidis</i>	71	20.82
<i>S. haemolyticus</i>	33	9.68
<i>S. cohnii</i>	28	8.21
<i>S. aureus</i>	16	4.69
<i>S. warneri</i>	7	2.05
<i>S. lugdunensis</i>	5	1.47
<i>S. equorum</i>	5	1.47
<i>S. capitis</i>	4	1.17
<i>S. sciuri</i>	3	0.88
<i>S. simulans</i>	2	0.59
<i>S. pettenkoferi</i>	2	0.59
<i>S. arletae</i>	1	0.29
<i>S. caprae</i>	1	0.29
<i>S. carnosus</i>	1	0.29
<i>S. pasteurii</i>	1	0.29
<i>S. succinus</i>	1	0.29
<i>S. xylosum</i>	1	0.29
<i>S. saprophyticus</i>	1	0.29
Otros géneros	10	2.93
Total	341	100.00

7.2 Nivel de producción de biofilm

Los aislamientos de *S. hominis* mostraron tener capacidad de producir biofilm de manera *in vitro* sobre superficies de poliestireno. Cerca del 80% de los aislamientos mostraron ser productores de biofilm. El 64.86% (96/148) se clasificaron como fuertes productores, el 12.83% (19/148) mostraron ser productores débiles y el 22.29% (33/148) no son productores. La clasificación se llevó a cabo tomando en cuenta los rangos en la densidad óptica propuestos por Christensen (Christensen *et al.* 1985).

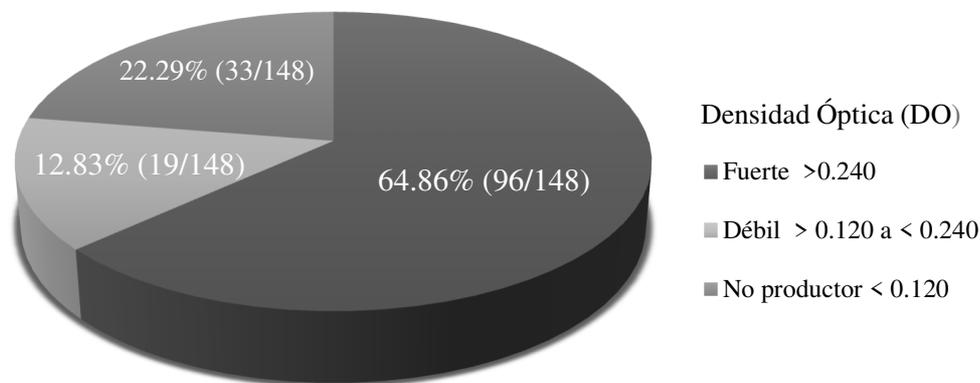


Figura 1. Nivel de producción de biofilm. Porcentajes de los aislamientos de *S. hominis* (n=148) con distinto nivel de producción de biofilm

7.3 Composición del biofilm

7.3.1 Composición del biofilm sin antibióticos

La composición del biofilm en los aislamientos de *S. hominis* mostró ser heterogénea. El principal componente fueron las proteínas, mostrando altos valores de desprendimiento de biofilm al ser tratadas enzimáticamente con proteinasa k, con un promedio de desprendimiento del 91.2%. Los porcentajes de desprendimiento para los carbohidratos varió entre 5-80%, en la figura 2 se puede apreciar que casi la mitad de los aislamientos no tuvieron desprendimiento. Los porcentajes de desprendimiento de ADN extracelular varían entre 2-95%, predominando los valores con desprendimiento intermedio. La composición del biofilm está relacionado al nivel de desprendimiento, valores altos de desprendimiento indica mayor presencia en la matriz extracelular y viceversa.

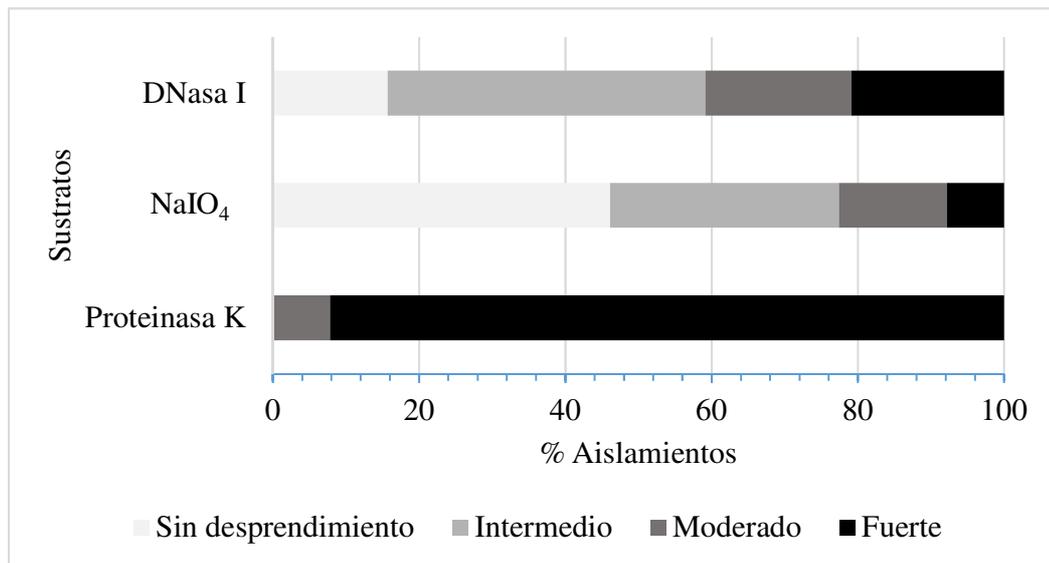


Figura 2. Porcentaje de desprendimiento de biofilm. Nivel de desprendimiento de biofilm de *S. hominis* (n=115) después del tratamiento con Proteínasa K, NaIO₄ y DNasa I.

7.3.2 Composición del biofilm con concentraciones subinhibitorias de antibióticos

La composición del biofilm con la adición de concentraciones subinhibitorias de linezolid (LZD, 0.06 µg/ml) y vancomicina (VAN, 0.03 µg/ml) muestran una composición heterogénea. Los porcentajes más altos de desprendimiento se observan en las proteínas, tanto con concentraciones subinhibitorias de LZD y VAN, obteniendo porcentajes promedio mayores entre 85 y 90%. Los porcentajes de desprendimiento para los carbohidratos mostraron valores entre 1-65% predominando los niveles bajos, esto tanto para LZD y VAN. Los porcentajes de desprendimiento de ADN extracelular varían entre 0-92%, de igual manera predominan los porcentajes de bajo desprendimiento con ambos antibióticos.

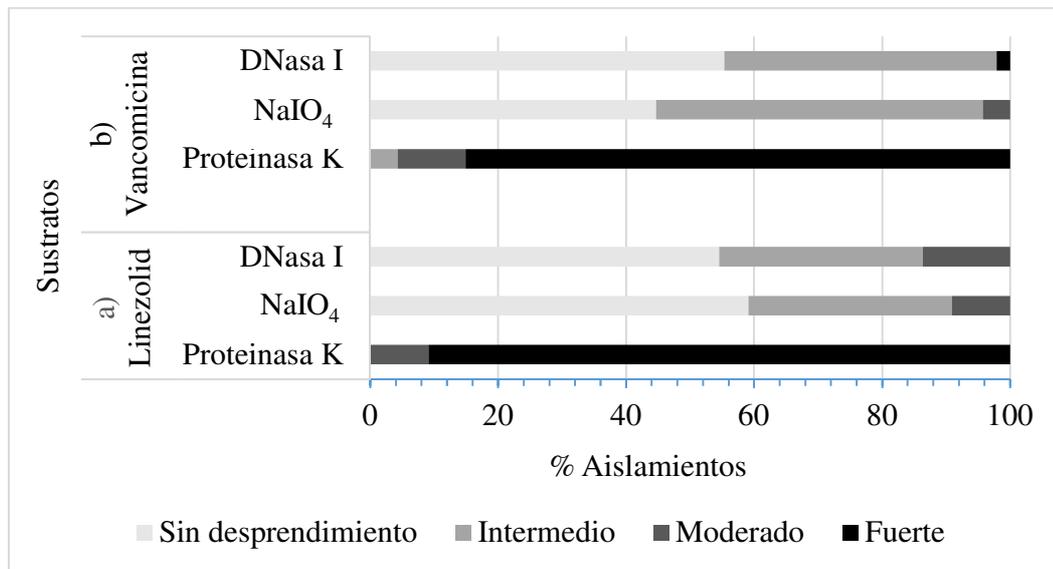


Figura 3. Porcentaje de desprendimiento de biofilm con concentraciones subinhibitorias de antibióticos. Nivel de desprendimiento de biofilm de *S. hominis* después del tratamiento con Proteínasa K, NaIO₄, y DNasa I con la adición de concentraciones sub inhibitorias de a) linezolid 0.06 µg/ml (n=44) y b) vancomicina 0.03 µg/ml (n=47)

No se observó una diferencia significativa entre los porcentajes de desprendimiento de proteínas en la composición del biofilm con la adición de antibióticos y sin ellos, en ambos casos el desprendimiento es mayor al 85%. En el caso de los porcentajes de desprendimiento para carbohidratos y ADN extracelular se aprecia un decremento en los porcentajes de desprendimiento aumentando el porcentaje de aislamientos en los que no se desprendió el biofilm, observado en ambos antibióticos VAN y LZD. El aumento en la baja del desprendimiento para el caso de carbohidratos no hay diferencia significativa al adicionar concentraciones subinhibitorias de LZD o VAN. Por el contrario, en el caso de ADN, si tiene una diferencia altamente significativa con ambos antibióticos Al obtener valores sin desprendimiento indica que la enzima no tuvo efecto sobre este componente del biofilm lo que indica su ausencia en el biofilm. Por el contrario, si se observan altos valores de desprendimiento indica que la enzima tuvo efecto sobre el sustrato lo cual indica que este componente está presente en la matriz.

7.4 Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biofilm.

La resistencia a las distintas clases de antibióticos utilizados fue mayor en células de biofilm a comparación de las células planctónicas en los ensayos *in vitro* realizados.

Se observa mayor proporción de resistencia en células planctónicas en los antibióticos de oxacilina, eritromicina, trimetoprima-sulfametoxazol, clindamicina, azitromicina y ciprofloxacino (Figura 4). En el caso de linezolid sólo cinco aislamientos resultaron resistentes. Para vancomicina todos los aislamientos mostraron sensibilidad.

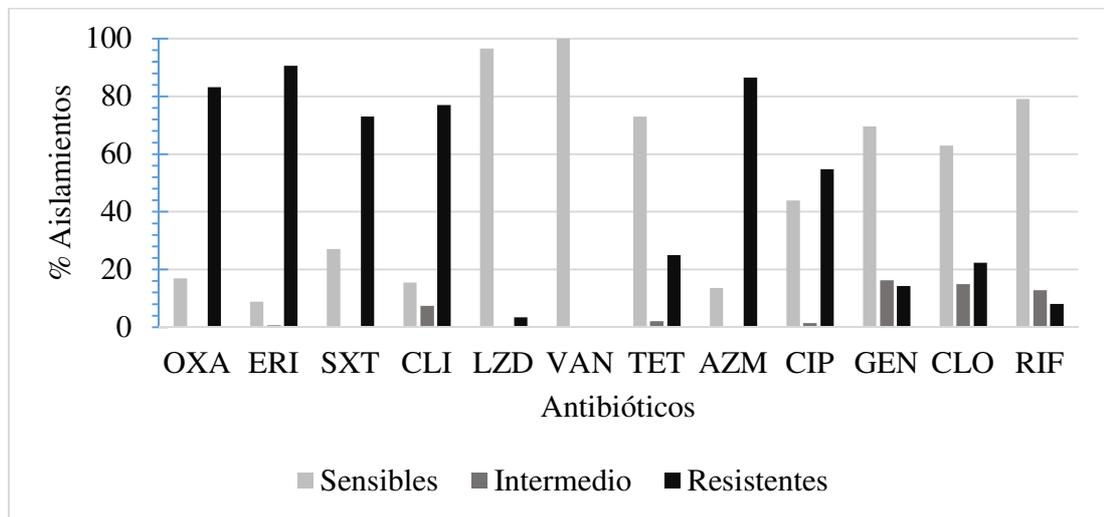


Figura 4. Porcentajes de susceptibilidad y resistencia a antibióticos en células planctónicas de *S. hominis*. OXA: oxacilina, ERI: eritromicina, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, CLI: clindamicina, LZD: linezolid, VAN: vancomicina, TET: tetraciclina, AZM: azitromicina, CIP: ciprofloxacino, GEN: gentamicina, CLO: cloranfenicol, RIF: rifampicina.

Se observó un aumento en la resistencia a los antibióticos cuando la célula se encuentra dentro del biofilm a comparación de las células planctónicas (Figura 5). Se obtuvo una resistencia del 100% en la mayoría de los antibióticos a excepción de vancomicina. En el caso de este antibiótico, en células planctónicas no se observó resistencia, esto a diferencia de las células de biofilm donde la resistencia fue del 100%.

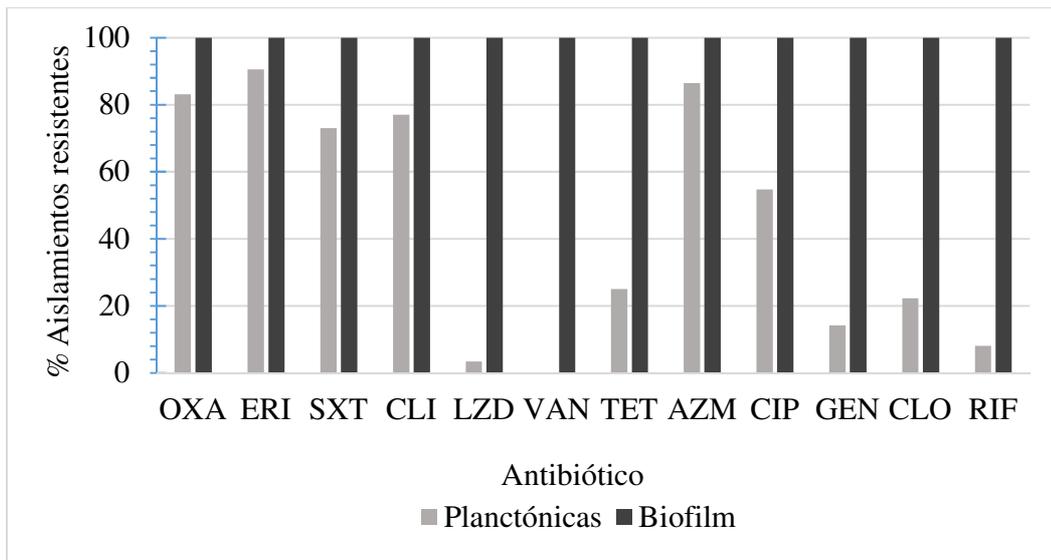


Figura 5. Porcentajes de resistencia a antibióticos en células planctónicas y de biofilm de *S. hominis*. OXA: oxacilina, ERI: eritromicina, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, CLI: clindamicina, LZD: linezolid, VAN: vancomicina, TET: tetraciclina, AZM: azitomicina, CIP:ciprofloxacino , GEN: gentamicina, CLO: cloranfenicol. RIF: rifampicina.

Para todos los antibióticos utilizados se determinó la MIC₅₀ y MCEB₅₀, como aquella concentración que inhibe el 50 % de los aislamientos, mientras que la MIC₉₀ y MCEB₉₀ es la que inhibe el 90% de los mismos (Tabla 2). Para la mayoría de los casos, fue la misma concentración para MIC₅₀ y MCEB₉₀. Para los antibióticos TET, GEN, RIF se muestra un claro aumento entre cada CMI. Entre el tipo de célula, se observa un marcado aumento en células de biofilm, incluso no se pudo determinar la CMI debido a la alta resistencia observada.

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias en células planctónicas y de biofilm. Comparación entre CMI₅₀ y CMI₉₀ con CMEB₅₀ y CMEB₉₀ de cada antibiótico entre células planctónicas y células de biofilm

Antibiótico	Célula	CMI ₅₀	CMEB ₅₀	CMI ₉₀	CMEB ₉₀	%R (n)	%S (n)
OXA	Planctónica	≥1		≥1		83.11 (123)	16.89 (25)
	Biofilm	≥32		≥32		100 (21)	0 (0)
ERI	Planctónica	≥8		≥8		90.54 (134)	8.78 (13)
	Biofilm	≥256		≥256		100 (21)	0 (0)
SXT	Planctónica	8/152		≥8/152		72.97 (108)	27.03 (40)
	Biofilm	32/608		32/608		100 (21)	0 (0)
CLI	Planctónica	≥4		≥4		77.03 (114)	15.54 (23)
	Biofilm	256		256		100 (21)	0 (0)
LZD	Planctónica	≤2		≤2		3.38 (5)	96.62 (143)
	Biofilm	≥512		≥512		100 (21)	0 (0)
VAN	Planctónica	≤4		≤4		0 (0)	100 (148)
	Biofilm	≥512		≥512		100 (21)	0 (0)
TET	Planctónica	≤4		≥32		25 (37)	72.97 (108)
	Biofilm	≥512		≥512		100 (21)	0 (0)
AZM	Planctónica	≥16		≥16		86.49 (128)	13.51 (20)
	Biofilm	256		256		100 (21)	0 (0)
CIP	Planctónica	≥8		≥8		54.73 (81)	43.92 (65)
	Biofilm	≥256		≥256		100 (21)	0 (0)
GEN	Planctónica	≤4		16		14.19 (21)	69.59 (103)
	Biofilm	≥512		≥512		100 (21)	0 (0)
CLO	Planctónica	≤8		≥32		22.30 (33)	62.84 (93)
	Biofilm	≥512		≥512		100 (21)	0 (0)
RIF	Planctónica	≤1		2		8.11 (12)	79.05 (117)
	Biofilm	64		≥256		100 (21)	0 (0)

7.4.1 Detección del gen *mecA*

Una alta proporción de los aislamientos se les detecto la presencia del gen *mecA*. El 83.1% de los aislamientos fueron positivos, mientras que el 16.9% fueron negativos. Se observó la relación de aquellos aislamientos con presencia del gen *mecA* fueron resistentes a oxacilina y aquellos con ausencia del gen mostraron ser sensibles.

Tabla 3. Detección del gen *mecA*. Porcentaje de aislamientos con presencia y ausencia del gen.

	Porcentaje (n)	%R (n) OXA	%S (n) OXA
Presencia	83.10 (123/148)	100(25/25)	0(0/25)
Ausencia	16.89 (25/148)	0(0/123)	100(123/123)

%R: porcentaje de aislamientos resistentes, %S: porcentaje de aislamientos sensibles, OXA: oxacilina.

7.5 Comparación de espectros mediante ClinPro Tools

El análisis estadístico se realizó mediante el software ClinProTools en busca de picos estadísticamente significativos, se compararon los espectros de los aislamientos no productores contra los aislamientos productores de biofilm. Se tomó en cuenta el valor de p para la prueba de Anderson-Darling (PAD) en donde, si $PAD > 0.05$ (distribución normal) se tomó en cuenta el valor p del análisis de varianza de la prueba t-student (PPTA) ≤ 0.05 , mientras que si $PAD \leq 0.05$ se tomó en cuenta el valor p de la prueba Wilcoxon/Kruskal–Wallis (PWKW) ≤ 0.05 . Estos criterios fueron seleccionados de acuerdo con el manual del software. Se seleccionó un pico de interés como representativo del total de picos encontrados para visualizar la diferencia.

El análisis estadístico para la comparación de los espectros de los aislamientos no productores y productores de biofilm mostró la presencia de 30 posibles picos de interés, de acuerdo con su significancia estadística. Para uno de los picos, PAD fue > 0.05 lo que indica una distribución normal, por lo cual se tomó en cuenta el PPTA ≤ 0.05 . Para los 29 picos restantes el PAD fue ≤ 0.05 siguiendo una distribución anormal y se tomó en cuenta PWKW ≤ 0.05 (Tabla 4). Se seleccionó aleatoriamente el pico No. 19 como un representativo del total de picos con posible interés (Figura 6). Se observa la diferencia entre el promedio de los espectros de los aislamientos no productores (rojo) y los aislamientos productores (verde) de biofilm, donde visualmente se observa una diferencia en el tamaño del pico entre los dos grupos.

Tabla 4. Análisis estadístico de los picos de interés en la producción de biofilm

Pico	Masa	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2
8	2166.45	1.02	0.131	0.0249	0	3.08	4.1
19	2981.19	1.17	0.0437	0.0133	0.000561	2.62	3.79
33	3905.86	0.42	0.777	0.0249	< 0.000001	2.6	3.02
49	4667.17	0.42	0.136	0.0407	< 0.000001	2.42	2
52	4712.16	2.92	0.143	0.0245	< 0.000001	6.61	3.68
53	4735.44	2.47	0.129	0.0122	< 0.000001	5.77	3.31
54	4756.5	0.88	0.143	0.044	< 0.000001	2.81	1.93
61	4916.08	1.17	0.129	0.0313	0.0151	4.72	5.89
86	6368.47	0.3	0.0437	0.00607	0	1.23	1.54
95	6607.9	9.62	0.136	0.0311	< 0.000001	15.83	6.21
96	6624.26	1.65	0.136	0.0334	< 0.000001	4.38	2.73
97	6646.47	1.63	0.131	0.0471	0.000038	8.14	6.51
109	7260.72	0.24	0.0437	0.0245	< 0.000001	0.8	1.04
110	7285.71	0.25	0.143	0.0152	< 0.000001	0.91	1.16
115	7631.83	0.42	0.143	0.0249	< 0.000001	1.31	1.73
118	7797.74	0.25	0.167	0.0471	0.00000137	0.97	1.22
119	7935.14	0.41	0.425	0.00955	< 0.000001	0.82	1.23
120	7956.68	0.34	0.194	0.0465	< 0.000001	1.12	1.46
143	10439.99	0.08	0.28	0.0245	< 0.000001	0.42	0.49
148	11445.22	0.05	0.131	0.0295	0.00000837	0.27	0.32
151	11696.24	0.05	0.143	0.0466	< 0.000001	0.28	0.33
153	12820.7	0.04	0.143	0.0231	0.032	0.24	0.28
155	13307.42	0.05	0.252	0.0129	< 0.000001	0.23	0.27
156	13538.46	0.04	0.129	0.0446	< 0.000001	0.23	0.27
158	14566.31	0.05	0.129	0.0376	< 0.000001	0.24	0.29
159	15125.82	0.42	0.131	0.00955	< 0.000001	0.47	0.89
160	15591.75	0.06	0.129	0.0245	0.00718	0.25	0.3
161	15865.69	0.12	0.143	0.00229	< 0.000001	0.21	0.32
162	15982.08	0.07	0.0437	0.00607	< 0.000001	0.17	0.24
163	16446.62	0.03	0.0437	0.0186	0.0671	0.18	0.21

Abreviaciones: DAve: Diferencia entre el promedio máximo y mínimo de cada pico en área/intensidad de las clases.; PTTA: Valor p del análisis de varianza T-student; PWKW: Valor p para la prueba de Wilcoxon/Kruskal–Wallis(datos sin distribución normal); PAD: Valor p para la prueba de Anderson–Darling,(indica una distribución no normal si ≤ 0.05 , y una distribución normal si > 0.05); Ave1 y Ave2: Promedio de cada pico en relación área/intensidad de la clase 1: no productores y clase 2: productores.

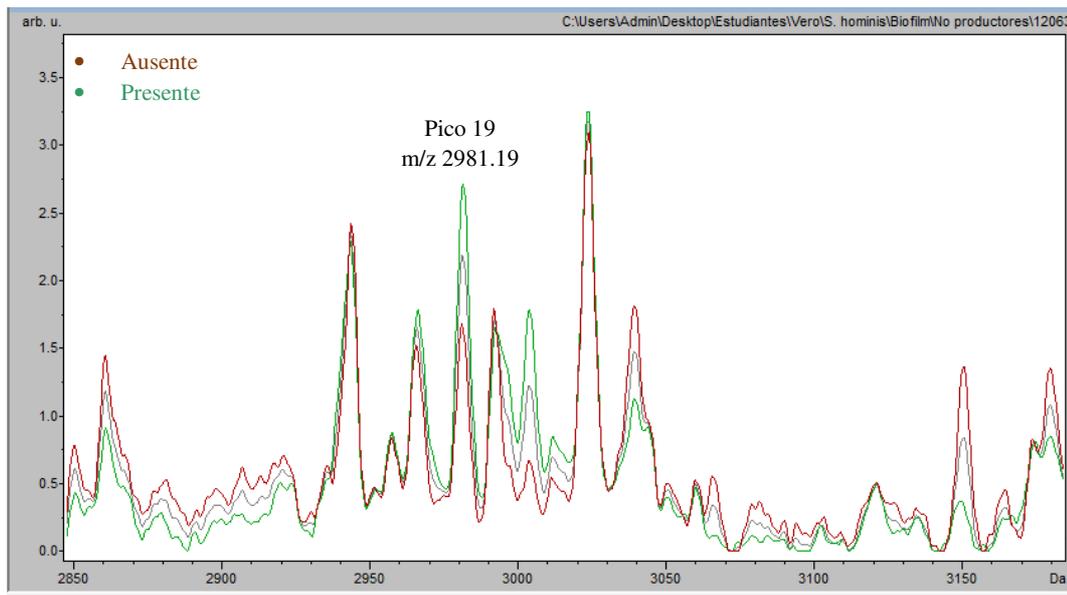


Figura 6. Pico representativo de interés como marcador proteico entre los aislamientos productores y no productores de biofilm. Se observa la media de los espectros de cada grupo. (Rojo: no productores, verde: productores, gris: media total).

En el caso del análisis de los espectros en relación con el gen *mecA*, se compararon los aislamientos con presencia y ausencia del gen. Se encontraron 17 posibles picos marcadores con significancia estadística. Dos de los picos se mostraron un PAD >0.05 y con un PTTA \leq 0.05. Los quince picos restantes su PAD fue \leq 0.05 y con un PWKW \leq 0.05. Se seleccionó al azar el pico no. 128 como un pico representativo del total de los picos de interés. Se observa claramente que los aislamientos con la presencia del gen, ese pico se ve reducido, mientras que los aislamientos con ausencia del gen, el pico se ve con mayor intensidad (Figura 7).

Tabla 5. Análisis estadístico de los picos de interés relacionados con el gen *mecA*

Pico	Masa	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2
21	2966.05	0.44	0.225	0.0492	0	3.15	2.7
26	3237.74	10.75	0.036	0.03	0.601	45.63	56.38
28	3303.71	3.79	0.00976	0.03	< 0.000001	2.92	6.71
29	3321.82	1.35	0.0276	0.0115	0.319	4.21	5.56
47	4519.64	3.14	0.0276	0.0115	< 0.000001	6.15	3
63	4884.32	0.58	0.154	0.0321	< 0.000001	2.57	1.98
87	6241.32	0.31	0.0442	0.0227	0.000174	1.52	1.21
96	6576.03	0.7	0.0556	0.0451	< 0.000001	2.63	3.32
97	6592.74	1.01	0.0171	0.03	< 0.000001	2.18	3.19
100	6646.59	2.32	0.0316	0.0115	0.0000568	4.96	7.28
123	8135.22	0.64	0.036	0.0227	0.0000623	2.95	2.3
128	9034.98	2.05	0.036	0.00323	< 0.000001	3.06	1.01
130	9091.76	0.26	0.036	0.0115	0.00000694	1.02	0.76
132	9181.15	0.35	0.0276	0.0227	0.0004	1.66	1.31
133	9656.54	3.12	0.123	0.0493	< 0.000001	12.74	9.62
149	11520.04	0.28	0.0733	0.0257	0.0000582	1.33	1.05
156	13281.62	0.05	0.036	0.0227	0.00201	0.26	0.21

Abreviaciones: DAve: Diferencia entre el promedio máximo y mínimo de cada pico en área/intensidad de las clases.; PTTA: Valor p del análisis de varianza t-student; PWKW: Valor p para la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis(datos sin distribución normal); PAD: Valor p para la prueba de Anderson-Darling.(indica una distribución no normal si ≤ 0.05 , y una distribución normal si > 0.05); Ave1 y Ave2: Promedio de cada pico en relación área/intensidad de la clase 1: ausencia del gen y clase 2: presencia del gen.

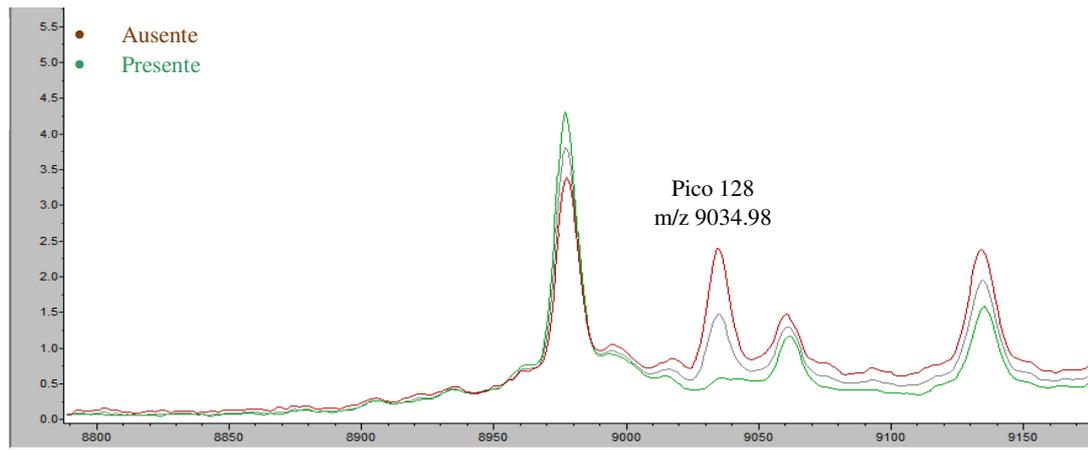


Figura 8. Pico representativo de interés como marcador proteico entre los aislamientos con presencia y ausencia del gen *mecA*. Se observa la media de los espectros de cada grupo. (Rojo: ausencia, verde: presencia, gris: media total).

8. DISCUSIÓN

El aislamiento de ECN a partir de especímenes clínicos, en un principio no se consideraban relevantes y solo eran considerados contaminación al manipular la muestra, debido a su rol como comensal en la piel de animales y humanos sanos. Con el paso de los años se han reconocido como los agentes etiológicos de distintos tipos de infecciones, principalmente en el torrente sanguíneo, las cuales se han asociado al uso catéter por su invasividad en el paciente.

S. hominis es la tercera especie más recuperada de bacteriemias dentro de los ECN. Sin embargo, no se han estudiado lo suficiente los factores de virulencia de esta bacteria, la gran mayoría de las investigaciones están enfocados a especies como *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*.

Este trabajo demuestra la importancia del estudio de los factores de virulencia de *S. hominis*, es una bacteria con la capacidad de formar biofilm en gran abundancia, lo cual potencia la resistencia a varias clases de antibióticos. Para poder lograr la eliminación del biofilm es necesario comprender todos los aspectos del mismo y como se interacciona con el antibiótico.

Los resultados obtenidos en los aislamientos seleccionados muestran una mayor proporción de *S. hominis*. Se encontró que, de las tres especies aisladas con mayor frecuencia, el 43.4% (148/341) correspondió a *S. hominis*, el 20.82% (71/341) a *S. epidermidis* y el 9.68% (33/341) a *S. haemolyticus* (Tabla 1). Diversos estudios han reportado que, dentro de los ECN, *S. epidermidis* es la especie principalmente recuperada de aislamientos provenientes de sangre, seguida por *S. haemolyticus* y *S. hominis* en tercer lugar (Uyanik *et al.* 2014; Becker *et al.* 2014). En este estudio los criterios de inclusión fueron aislamientos clasificados como ECN, y se descartaron aquellos identificados como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*. Esto puede explicar el por qué a diferencia de lo reportado previamente, *S. hominis* fue la principal especie aislada de sangre.

Los problemas de identificación a nivel especie entre los ECN es debido a la gran similitud tanto genética como fenotípica. Los métodos de identificación utilizados en un principio eran los sistemas bioquímicos API®; estos muestran alto porcentaje de discriminación entre las especies de ECN más frecuentes, teniendo problemas de discriminación entre las menos frecuentes, como es el caso de *S. hominis*, en donde estudios han observado que este método presenta un error de identificación del 25%, ocasionando identificaciones erróneas (Cunha *et al.* 2004). La implementación del uso del equipo MALDI-TOF, ha demostrado ser un método de identificación precisa y rápida, mostrando porcentajes de identificación 95-99% de concordancia (Zhu *et al.* 2015). Incluso se ha reportado concordancia y una especificidad del 100% para la identificación de aislamientos de *S. hominis* con el uso del MALDI-TOF (Delport 2015). Con este equipo se ha podido identificar correctamente a especies poco frecuentes, resaltando la relevancia clínica de estas. Tal es el caso de *S. hominis*, que en este trabajo se obtuvo un gran número de aislamientos (n= 148), mayor al número de aislamientos utilizados en otros estudios utilizando sistemas de identificación como API® o Vitek®. (Layer *et al.* 2006) Esto comprueba la precisión del MALDI-TOF para la identificación, aumentando la correcta identificación y la relevancia clínica que en realidad presenta esta bacteria, que no se observaba años atrás por la falta de precisión en los métodos de identificación.

Las infecciones que involucran a microorganismos formadores de biofilm son de gran importancia e interés debido a la dificultad que se tiene en el tratamiento. En este trabajo se obtuvieron resultados muy interesantes respecto a la formación de biofilm, debido a que, cerca del 80% (115/148) de los aislamientos de *S. hominis* mostraron ser productores de biofilm; del total de los aislamientos, el 64.86% (96/148) se clasificaron como fuertes productores (Figura 1). Los estudios disponibles relacionados a la producción de biofilm de esta bacteria son limitados ya que estos están enfocados a otras especies como *S. epidermidis*. Cabe destacar que, de los estudios disponibles, el número de aislamientos analizados es muy reducido, comúnmente n= ≤60 (Garza *et al.* 2011; Szczuka *et al.* 2015; Mendoza *et al.* 2015; De Olivera *et al.* 2016). En este trabajo se obtuvo una n= 148 aislamientos. En estudios recientes se han reportado aislamientos clínicos productores de biofilm con una frecuencia de 50-90% de aislamientos

analizados, utilizando la misma metodología propuesta por Christensen y colaboradores (Szczyka *et al.* 2015; Mendoza *et al.* 2015). En este trabajo se encontró que el 77% de los aislamientos fueron productores de biofilm, lo cual es muy similar con los resultados reportados en los trabajos mencionados.

La producción de biofilm se ha relacionado con una mayor virulencia, principalmente en los aislamientos que son provenientes de sangre, por la persistencia de la bacteria y su difícil erradicación. Los resultados en esta investigación sugieren la importancia del rol del biofilm para establecer y mantener la infección.

El biofilm es una red de compuestos secretados por la bacteria, que estos pueden ser carbohidratos, proteínas, ácidos teicoicos o ADN extracelular. La principal molécula implicada en la adhesión es un carbohidrato llamado poli-*N*-acetilglucosamina. Este carbohidrato se ha encontrado presente en el biofilm de *S. epidermidis*, siendo el componente con mayor abundancia, seguido de proteínas y en menor proporción ADN extracelular. (Otto M. 2008). Resultados similares se han encontrado en el biofilm de *S. aureus*, y en otras especies como en *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, entre otras (Archer *et al.* 2011; Ribeiro *et al.* 2016; Mann y Wozniak 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el principal componente de biofilm en los aislamientos analizados de *S. hominis* son las proteínas, seguido de una composición heterogénea de carbohidratos y ADN extracelular. Aunque las proteínas fueron más abundantes, algunos aislamientos mostraron tener alta proporción de carbohidratos y proteínas en conjunto. Lo cual indica que la composición es dependiente del aislamiento. Existen pocos estudios en donde se encuentran resultados similares, en donde se reporta que carbohidratos y proteínas son los principales componentes del biofilm, de igual manera en algunos aislamientos la composición fue dependiente del mismo aislamiento variando en su composición (Mendoza *et al.* 2015; Szczyka *et al.* 2015). Se ha reportado en *S. lugdunensis* que los carbohidratos no son el componente principal de la matriz extracelular del biofilm. Mediante ensayos enzimáticos junto con microscopía confocal de fluorescencia, se reportó la presencia de abundantes proteínas en el biofilm de *S. lugdunensis*, aunque se encontró un homólogo del locus *icaADBC* que contiene genes cuyos productos forman el poli-*N*-acetilglucosamina, principal

carbohidrato en la composición del biofilm, este no fue el mayor componente del biofilm (Frank y Patel 2007). Estas informaciones junto con los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la composición del biofilm es más heterogénea en los ECN y no necesariamente los carbohidratos son el componente principal del biofilm como se ha establecido para otros microorganismos productores. Además, se sugiere que existen distintas vías genéticas para su formación. Aun no existe mucha información al respecto en ECN.

El biofilm crea una barrera física que le confiere a las células bacterias protección del ambiente externo, incluidos los antibióticos. Existen reportes los cuales muestran que las células que son capaces de formar biofilm tienen hasta 1000 veces mayor resistencia a los antibióticos. Además, el biofilm protege a las bacterias de las células del sistema inmune, haciendo difícil la erradicación de la infección. Los antibióticos contra estafilococos, en concentraciones terapéuticas han mostrado tener la habilidad de inhibir la adhesión del biofilm en las superficies en modelos *in vitro*, una vez establecido el biofilm el antibiótico pierde su efecto por la poca penetración de este a través del biofilm para actuar sobre las células bacterianas (Cedric *et al.* 2014).

Concentraciones subinhibitorias del antibiótico no son capaces de erradicar o inhibir a la bacteria. Se han realizado estudios sobre el efecto que tienen concentraciones subinhibitorias de varios antibióticos sobre la virulencia de la bacteria. Trabajos realizados en *S. aureus* mostraron que concentraciones subinhibitorias de cefalexina, ciprofloxacino y roxithromicina, tienen un efecto en la expresión del biofilm, dependiendo de la concentración y el tipo de antibiótico utilizado (Haddadin *et al.* 2010). Otros estudios realizados en *S. epidermidis* mostraron que, concentraciones subinhibitorias de tetraciclina y quinupristina-dalfopristina aumenta la expresión de los genes *ica* los cuales están relacionados con la producción de poli-*N*-acetilglucosamina (Rachid *et al.* 2015). Además, concentraciones subinhibitorias de eritromicina, azitromicina y claritromicina potenciaban la formación del biofilm hasta en un 20% (Wang *et al.* 2010). En este trabajo se observó que concentraciones subinhibitorias de linezolid y vancomicina, tienen efecto significativo en la producción de biofilm *in vitro*. La composición del biofilm mostró un cambio significativo al adicionar concentraciones subinhibitorias de LZD y VAN, aunque las proteínas siguen siendo el principal

componente. Se observó un aumento en los porcentajes de aislamientos sin desprendimiento del biofilm de carbohidratos y ADN extracelular. En el caso de los carbohidratos este no tuvo un efecto significativo, sin embargo, en el ADN extracelular si hubo un efecto altamente significativo para ambos antibióticos, lo que sugiere que estos componentes disminuyen al estar en contacto con el antibiótico, aunque se observó que la composición es muy heterogénea entre cada aislamiento. No se encontraron estudios en donde se reportan estos resultados con *S. hominis*. Kaplan y colaboradores en el 2011 reportaron que concentraciones subinhibitorias de vancomicina modificaban la composición del biofilm en ciertos aislamientos de *S. epidermidis*, dependiendo de estos, aumentaba la producción de poli-*N*-acetilglucosamina o ADN extracelular en presencia del antibiótico. Este estudio concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo referente a que concentraciones subinhibitorias de antibióticos modifican la composición del biofilm, en este caso en el ADN extracelular. Cabe destacar que en este trabajo sólo se utilizó una concentración subinhibitoria estándar para todos los aislamientos, mientras que los trabajos reportados se han utilizado distintas concentraciones subinhibitorias basándose en la CMI de cada aislamiento, por lo que no se sabe cómo pueden afectar al biofilm otras concentraciones de antibióticos que son subinhibitorias.

La resistencia a antibióticos en *S. hominis* se observó principalmente para OXA, ERI, SXT, CLI y AZM (Figura 4). Resultados similares se han reportado en diferentes investigaciones donde se reportan aislamientos de *S. hominis* resistentes a los mismos antibióticos o las mismas clases de estos utilizados en este estudio (Abdalla *et al.* 2013; Roy *et al.* 2014) La resistencia a OXA es relevante, ya que aislamientos resistentes a este antibiótico suponen ser meticilina resistentes, lo cual implica una resistencia no solo en las penicilinas, si no a otras clases de antibióticos. Se encontró que en los aislamientos resistentes a OXA se observó la presencia del gen *mecA* y en aquellos aislamientos sensibles no se detectó, encontrando relación entre la del gen y la resistencia, concordando con reportes realizados en años recientes (Mendoza *et al.* 2013; 2015). En este trabajo, los aislamientos analizados mostraron altos porcentajes de sensibilidad a vancomicina y linezolid, en este último se encontraron cinco aislamientos resistentes. Su importancia radica en que son antibióticos de último recurso en el tratamiento de

infecciones resistentes a otros antibióticos, en donde se destaca la vigilancia que se debe de tener con los aislamientos resistentes a estos antibióticos. Se ha reportado baja resistencia a LZD y VAN en aislamientos de *S. hominis* de especímenes clínicos, concordando con los resultados obtenidos en este trabajo (Bing Gu *et al.* 2013; Won *et al.* 2013).

Dentro del biofilm la resistencia a los antibióticos utilizados fue mayor a comparación con las células planctónicas (Figura 5). Esto ocurrió para todos los antibióticos evaluados, incluso en el caso de VAN y LZD que son utilizados como antibiótico de último recurso. Esto destaca la importancia de la formación del biofilm de *S. hominis*, ya que, al momento de causar una infección, el tratamiento es muy difícil prolongando la medicación y la estancia en hospitales propiciando a una infección múltiple por otros patógenos en el ambiente hospitalario. Estudios han reportado un aumento en la resistencia a los antibióticos en células de biofilm en aislamientos de distintas especies de estafilococos, incluyendo a *S. hominis*, concordando con los resultados obtenidos (Mendoza *et al.* 2015; de Olivera *et al.* 2016). Aun no se ha esclarecido el aumento en la resistencia en las células inmersas en el biofilm, se puede pensar que la composición del biofilm es influyente para que el antibiótico no pueda ejercer efecto sobre las células bacterianas, esto se puede deber a la estructura que se forma dependiendo de su composición o las interacciones entre la matriz con el antibiótico que lo vuelven menos efectivo o limitan la exposición con la bacteria. En el caso de *S. hominis* aún no se tienen reportes de cómo la composición del biofilm le favorezca para aumentar la resistencia a los antibióticos.

Los resultados muestran que la formación de biofilm y la presencia del gen *mecA*, forman parte de los factores de virulencia más importantes en *S. hominis*, debido a que ambos ayudan a la bacteria a la resistencia a antibióticos. Los métodos para detectar si una bacteria es productora de biofilm o si presenta genes de resistencia, son muy laboriosos, requiriendo de días para poder obtener un resultado, cuando en el área clínica es de vital importancia la rapidez en los mismos. Por lo cual se buscan otros métodos que agilicen este proceso y se pueda llegar a un resultado en corto tiempo. En los últimos años la espectrometría de masas ha adquirido fuerza en el área clínica como un método de identificación microbiana muy rápido, muy sensible y específico, además de que los

insumos son baratos. Se conocen muchas potenciales aplicaciones de la espectrometría de masas, no sólo en la identificación bacteriana, también en la tipificación microbiana, al poder clasificar en grupos a las bacterias de una misma especie, medir la susceptibilidad microbiana, etc. (van Belkum *et al.* 2012). Los marcadores proteicos al ser los productos de expresión de un gen tienen mayor aplicabilidad a comparación de los marcadores genéticos, ya que estos, aunque estén presentes no se sabe si se expresa o no. Al detectar un marcador proteico que ya esté bien estudiado, solo se necesita saber si existe la presencia de este para poder determinar, por ejemplo: si la bacteria es resistente o sensible a algún antibiótico.

En este trabajo se buscaron posibles marcadores proteicos para a la detección de aislamientos productores de biofilm o aislamientos que presenten el gen *mecA*. Se realizó la clasificación de los aislamientos, tomando los datos obtenidos a partir de la identificación por MALDI-TOF. Los perfiles proteicos se analizaron mediante el software ClinProTools 3.0. Para ambos casos, se encontraron picos estadísticamente significativos (30 para biofilm y 17 para *mecA*), que son de interés ya que tienen potencial uso como marcadores proteicos por la diferencia significativa entre los grupos analizados. Cabe a destacar que estos resultados son a partir del perfil proteico previamente obtenidos mediante la identificación convencional, utilizando los reactivos y el procedimiento ya establecido. El análisis del perfil proteico en busca de marcadores está en desarrollo y se cuentan con trabajos muy limitados. Para el caso de estafilococos, un estudio realizado por Camoez y colaboradores en el año 2015, encontraron posibles picos marcadores para poder categorizar en complejos clonales a *S. aureus* resistentes a meticilina, donde utilizaron las mismas condiciones de este trabajo, encontraron posibles picos marcadores para poder clasificar a *S. aureus* y concluyen que esta tecnología es muy prometedora. Adicionalmente, se han realizado trabajos para categorizar otras especies bacterianas, Por ejemplo: la para la clasificación de *E. coli* entre el tipo 131, obteniendo picos marcadores muy prometedores para su clasificación (Lafolie *et al.* 2015).

La metodología en la extracción de las proteínas es un factor importante para considerar, ya que, dependiendo del método será la cantidad y el tipo de proteínas extraídas. Además, en el equipo MALDI-TOF existen varios tipos de matriz que cada una tiene una función específica, por lo cual para la búsqueda de marcadores proteicos se tienen que tomar en cuenta el método de extracción y la matriz utilizada para poder obtener las proteínas que puedan ser marcadores. Aún existe mucho campo de investigación en esta área, ya que este es el primer reporte que se obtiene de posibles picos marcadores proteicos para *S. hominis* en la clasificación del biofilm y la detección del gen *mecA*, aunque aún hay que validar estos resultados.

9. CONCLUSIONES

- Dentro de los aislamientos seleccionados a partir de especímenes clínicos, *S. hominis* fue la especie predominante abarcando el 43.4% del total.
- Del total de los aislamientos el 77.7% fueron productores de biofilm, de los cuales el 83.76% se clasificaron como fuertes productores.
- La composición del biofilm mostro ser heterogénea, y las proteínas fueron el componente en mayor abundancia.
- Concentraciones subinhibitorias de linezolid y vancomicina no tuvieron un efecto significativo en la composición de proteínas ni carbohidratos, sin embargo, sí tuvo un aumento significativo en el decremento en el ADN extracelular con ambos antibióticos.
- Se observó una alta resistencia en células planctónicas a los antibióticos oxacilina, eritromicina, trimetoprima-sulfametoxazol, clindamicina, azitromicina y ciprofloxacino.
- Se observó un incremento en la farmacorresistencia en células de biofilm en todos los antibióticos probados.
- Se encontró alta sensibilidad a vancomicina y a linezolid, en este último solo se encontraron cinco aislamientos resistentes.
- El 83% de los aislamientos fueron portadores del gen *mecA*, se observó que estos aislamientos mostraron resistencia a oxacilina. Los aislamientos con ausencia del gen mostraron sensibilidad al antibiótico.
- Se encontraron picos en el perfil proteico de los aislamientos con potencial uso de marcadores moleculares para determinar la producción de biofilm y la presencia del gen *mecA*.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar la estructura del biofilm de los aislamientos de *S. hominis*
- Determinar los genes involucrados la formación del biofilm y su expresión en células planctónicas y en células dentro del biofilm
- Determinar los genes involucrados en la resistencia a los antibióticos y su expresión en células planctónicas y en células dentro del biofilm
- Determinar la capacidad de formación de biofilm en distintas superficies
- Evaluar el efecto de concentraciones subinhibitorias de distintos antibióticos en la formación de biofilm
- Buscar y validar picos del perfil proteico como marcadores moleculares enfocados a la formación de biofilm, presencia de genes y la resistencia a antibióticos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdalla NM, Haimour WO, Osman AA, Sarhan MA, y Musaa, HA. 2013. Antibiotics Sensitivity Profile Towards *Staphylococcus hominis* in Assir Region of Saudi Arabia, 5(1), 171–183.

Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G. y Spiliopoulou I. 2006. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. Letters in Applied Microbiology 43(4), pp. 450–454.

Andersson DI. y Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nature Reviews. Microbiology 12(7), pp. 465–478.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Y Shirtliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. Virulence, 2(5), 445–459.

Argemi, X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, Jaulhac B, Prévost G, Schramm F. 2015. Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*. Journal of clinical microbiology 53(7):2030–36.

Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, von Eiff C. 2004. Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based. J Clin Microbiol. 42(11):4988-95

Becker K, Heilmann C, Peters G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. Clinical Microbiology Reviews, 27(4), 870–926.

Bing G, Theodoros K, Sotirios T, Janet H, Romney M. 2013. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. J Antimicrob Chemother; 68 (1): 4-11.

Balandin B, Lobo B, Orden B, Román F, García E, Martínez R, Valdivia M, Ortega A, Fernández I, y Galdos P. 2016. Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci in an intensive care unit. Infectious diseases (London, England) 48(5), pp. 343–349.

Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, Desprez A, Maiga A, Woerther PL, Gaillard K, Jeanrot C, Wolff M, Schrenzel J, Andreumont A y Ruimy R. 2010. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Journal of Infectious Diseases 202(2), pp. 270–281.

- van Belkum A, Welker M, Erhard M y Chatellier S. 2012. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 50(5), pp. 1513–1517.
- Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H. y Miragaia M. 2011. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements. *Plos One* 6(7), p. e21940
- Casey AL, Lambert PA, Elliott TS. 2007. Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29SUPPL: S23-32.
- Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer M, Vila J, y Roca I. 2016. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 22, 161.e1–161.e7.
- Cédric J y Caillon J. 2014 Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother*; 69 (suppl_1): i37-i40.
- Ceri H. 2001. Microbial Growth in Biofilms - Part B: Special Environments and Physicochemical aspects. *Methods in Enzymology* 337(1996):377–85.
- Cetin ET. 1962. Staphylococci Resistant to Methicillin ('Celbenin'). *British Medical Journal* 51–52.
- Chah KF, Gómez E, Nwanta, JA, Asadu B, Agbo IC, Lozano C, Torres C. 2014. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from healthy dogs in Nsukka, Nigeria, 220, 215–220.
- Chen H, Wu W, Ni M, Liu Y, Zhang J, Xia F, He W, Wang Q, Wang Z, Cao B, Wang H. 2006. Comparative Study Using Various Methods for Identification of *Staphylococcus* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 44(8):2824–30.
- Chen JHK, She KKK, Wong OY, Teng JLL, Yam WC, Lau SKP, Woo PCY, Cheng, VCC y Yuen KY. 2015. Use of MALDI Biotyper plus ClinProTools mass spectra analysis for correct identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis/oralis*. *Journal of Clinical Pathology* 68(8), pp. 652–656
- Christensen GD, Simpson GA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22(6):996–1006.
- CLSI 2015 supplement M100s. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th edición.
- Costerton JW. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284(1999):1318–22.

- Cunha M, Sinzato YK, Silveira LV. 2004. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(8):855–60.
- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2(2), pp. 114–122.
- De Oliveira A, Cataneli V., Pinheiro L., Moraes DF, Benini Martins K, y Ribeiro ML. 2016. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1423.
- Deka N. 2014. Comparison of Tissue Culture plate method, Tube Method and Congo Red Agar Method for the detection of biofilm formation by Coagulase Negative *Staphylococcus* isolated from Non-clinical Isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(10), pp. 810-815
- Delpont J. 2015. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by the Bruker MALDI-TOF Biotyper Compared To the Vitek 2 and MIS Gas Liquid Chromatography. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access* 1(1).
- Dubois N. 2010. Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 48(3):941–45.
- Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, Dauphin, B, Beretti JL, Alvarez AS, Degand N, Ferroni A, Rottman M, Herrmann JL, Nassif X, Ronco E y Carbonnelle E. 2010. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clinical Microbiology and Infection* 16(7), pp. 998–1004.
- Enrique R, Carmen IM, Pérez JL, Oliver A, Díaz P, Garau M, Gallegos CM, Socías A, Socías A, Ayestarán JI y Pareja A. 2011. Diseminación nosocomial de *Staphylococcus hominis* resistente al linezolid en dos hospitales de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R., Kaspar HM. 2013. Clinically significant coagulase-negative staphylococci: most frequent species and virulence factors. *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 30(5), 480-8.
- Febbraro F, Rodio DM, Puggioni G, Antonelli G, Pietropaolo V. y Trancassini M. 2016. MALDI-TOF MS Versus VITEK® 2: Comparison of Systems for the Identification of Microorganisms Responsible for Bacteremia. *Current Microbiology* 73(6), pp. 843–850.
- Frank KL, Robin P. 2007. Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infection and Immunity* 75(10):4728–42.

- Garza E, Morfin R, Martínez MA, Gonzalez E, González O, Rodríguez E. 2011. Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of *S. cohnii*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus sciuri*, 930–936.
- Haddadin NS, Saleh S, Al-Adham SI, Buultjens EJ y Collier PJ. 2010. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1281–1291.
- Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A., and Fluit, A.C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 43, 2286–2290.
- Jevons MP. 1961. Resistant Staphylococci. *British Medical Journal* 1:124–25.
- Kaplan JB, Jabbouri S, y Sadovskaya I. 2011. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Research in Microbiology*, 162(5), 535–541.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. 2000. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome Mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(6):1549–55.
- Ketterlinus R, Hsieh SY, Teng SH, Lee H y Pusch W. 2005. Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software. *Biotechniques Suppl*, pp. 37–40
- Kloos WE, George CG, Olgiate JS, Van Pelt L, McKinnon ML, Zimmer BL, Muller E, Weinstein MP y Mirrett S. 1998. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *International journal of systematic bacteriology* 48 Pt 3, pp. 799–812.
- Kloos WE, Bannerman TL. 1994. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical microbiology reviews* 7(1):117–40.
- Kloos WE, Schieffer KH. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. Pp. 82-88.
- Kloos WE y Schleifer KH. 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *International journal of systematic bacteriology* 25(1), pp. 62–79.
- Lafolie J, Sauget M, Cabrolier N, Hocquet D y Bertrand X. 2015. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies *The Journal of Hospital Infection* 90(3), pp. 208–212.
- Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, König W, y König B. 2006. Comparative Study Using Various Methods for Identification of *Staphylococcus* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2824–2830.

- Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M, Gao Q. 2005. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* Strains from Commensal to Invasive by Expression of the Ica Locus Encoding Production of Biofilm Exopolysaccharide. *Infection and Immunity* 73(5):3188–91.
- MacFaddin, Jean F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina, p. 99.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2015. Brock Biología de los Microorganismos. 14ª edición. Prentice-Hall. Madrid.
- Maira LT. 2002. Immunochemical Properties of the Staphylococcal Poly- N - Acetylglucosamine Surface Polysaccharide Immunochemical Properties of the Staphylococcal Poly- N -Acetylglucosamine Surface Polysaccharide. *Infection and immunity* 70(8):4433–40.
- Mann, EE, y Wozniak DJ. 2012. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 893–916.
- Martineau F, François JP, Danbing K, Sonia P, Paul HR, Marc O, Michel GB. 2001. Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. *Journal of clinical microbiology* 39(7):2541–47.
- Mendoza S, Morfín R, Villarreal L, Rodríguez E, Llaca J, Camacho A, González GM, Casillas N, Garza E. 2015. Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS ONE* 10(12):1–13.
- Mendoza S, Morfin R, Rodríguez E, Llaca J, Flores S, González GM, Villarreal L y Garza E. 2013. Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *Plos One* 8(4), p. e61161.
- Nasr RA, AbuShady HM y Hussein HS. 2012. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 13(3), pp. 269–274.
- Otto, M. 2008. Staphylococcal Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 207–228.
- Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G y Dumitrescu O. 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(7), pp. 1524–1532
- Panda PS, Chaudhary U y Dube SK. 2016. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 59(2), pp. 177–179.

- Raad, I, Alrahan I, Rolston K. 1998. *Staphylococcus epidermidis*: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 26:1182–87.
- Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, y Ziebuhr W. 2000. Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3357–3363.
- Ribeiro S, Marlon HC, Elizabete S, Octavio F. 2016 Review. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiol* vol. 11. No. 4.
- Roy P, Ahmed NH, Biswal I, Grover RK. Multidrug-resistant *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* causing septicemia in patients with malignancy. *Indian J Pathol Microbiol* 2014; 57:275-7
- Sin Autor. 2009. NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. México. Disponible en línea: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5120943&fecha=20/11/2009
- Singhal, N, Manish K, Pawan KK, Jugsharan SV. 2015. MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 6(AUG):1–16.
- Smith K, Gould KA, Ramage G, Gemmell CG, Hinds J y Lang S. 2010. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(1), pp. 380–387.
- Szczuka E, Jabłońska L y Kaznowski A. 2017. Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 163(5), pp. 712–718.
- Szczuka E, Makowska N, Bosacka K, Słotwińska A y Kaznowski A. 2016. Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens. *Folia Microbiologica* 61(2), pp. 143–147.
- Szczuka E, Telega K y Kaznowski A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiologica* 60(1), pp. 1–5.
- Szczuka E, Trawczyński K y Kaznowski A. 2014. Clonal analysis of *Staphylococcus hominis* strains isolated from hospitalized patients. *Polish Journal of Microbiology* 63(3), pp. 349–354.
- Tolker, T y Sternberg C. 2014. Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy. *Methods in Molecular Biology* 1149, pp. 615–629.

- Troccaz M, Gaia N, Beccucci S, Schrenzel J, Cayeux I, Starckenmann C y Lazarevic V. 2015. Mapping axillary microbiota responsible for body odours using a culture-independent approach. *Microbiome* 3(1), p. 3.
- Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ. 2001. Linezolid Resistance in a Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358(9277):207–8.
- Ugwu CC, Gomez SE, Agbo IC, Torres C, Chah KF. 2015. Characterization of mannitol-fermenting methicillin-resistant staphylococci isolated from pigs in Nigeria, 892, 885–892.
- Uyanik MH, Yazgi H, Ozden K, Erdil Z, y Ayyildiz A. 2014. Comparison of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures as a True Bacteremia Agent and Contaminant in Terms of Slime Production and Methicillin Resistance. *The Eurasian Journal of Medicine*, 46(2), 115–119.
- Voineagu L, Braga V, Botnariuc M, Barbu A y Tataru M. 2012. Emergence of *Staphylococcus hominis* Strains in General Infections. *ARS Medica Tomitana* 18(2).
- Wang Q, Sun FJ, Liu Y, Xiong LR, Xie LL y Xia PY. 2010. Enhancement of Biofilm Formation by Subinhibitory Concentrations of Macrolides in icaADBC-Positive and -Negative Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2707–2711.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. 2006. Koneman's color atlas and testbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Pp. 656 – 658.
- Won JY, y Kim M. (2013). Vancomycin-resistant *Staphylococcus hominis* endophthalmitis following cataract surgery. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 7, 1193–1195.
- Xiao D, Zhao F, Zhang H, Meng F y Zhang J. 2014. Novel strategy for typing *Mycoplasma pneumoniae* isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry coupled with ClinProTools. *Journal of Clinical Microbiology* 52(8), pp. 3038–3043.
- Zhu, W, Sieradzki K, Albrecht V, McAllister S, Lin W, Stuchlik O, Limbago B, Pohl J, Kamile RJ. 2015. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species. *J. Microbiol.Methods* 117(1872-8359,14-17.

12.RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Verónica Villarreal Salazar

Candidata para el grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS MOLECULAR Y MICROBIÓLOGICO DE LA FORMACIÓN DE
BIOFILM EN *Staphylococcus hominis*

Campo de estudio: Bacteriología médica

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México el 16 de julio de 1993,
hija de Ma. Guadalupe Villarreal Salazar.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
Autónoma de Nuevo León, en el año 2014 con el grado de Químico Bacteriólogo
Parasitólogo.

Experiencia profesional: Auxiliar de laboratorio y asistente de investigación en el
Laboratorio de Microbiología General, en el Departamento de Microbiología e
Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma
de Nuevo León.

ANEXOS

A. Datos de los aislamientos

Número	ID aislamiento	Identificación	Espécimen	Fecha	Procedencia
1	83	<i>S. hominis</i>	sangre	23/07/2006	HU
2	397	<i>S. hominis</i>	sangre	01/06/2006	HU
3	622	<i>S. hominis</i>	sangre	14/06/2006	HU
4	896	<i>S. hominis</i>	sangre	27/06/2006	HU
5	964	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2006	HU
6	1089	<i>S. hominis</i>	sangre	13/07/2006	HU
7	1103	<i>S. hominis</i>	sangre	14/07/2006	HU
8	1786	<i>S. hominis</i>	sangre	20/09/2006	HU
9	5135	<i>S. hominis</i>	sangre	30/08/2007	HU
10	8115	<i>S. hominis</i>	sangre	31/08/2007	HCG
11	8122	<i>S. hominis</i>	sangre	01/09/2007	HCG
12	8127	<i>S. hominis</i>	sangre	02/06/2008	HCG
13	8129	<i>S. hominis</i>	sangre	23/09/2008	HCG
14	8144	<i>S. hominis</i>	sangre	04/05/2009	HCG
15	8179	<i>S. hominis</i>	sangre	05/10/2009	HCG
16	9046	<i>S. hominis</i>	sangre	26/11/2009	HU
17	9157	<i>S. hominis</i>	sangre	10/02/2010	HU
18	9241	<i>S. hominis</i>	sangre	20/07/2009	HCG
19	9927	<i>S. hominis</i>	sangre	16/12/2010	HCG
20	9994	<i>S. hominis</i>	sangre	16/12/2010	HCG
21	10239	<i>S. hominis</i>	sangre	19/03/2011	HCG
22	10866	<i>S. hominis</i>	sangre	20/07/2011	HU
23	11062	<i>S. hominis</i>	sangre	27/08/2011	HU
24	11538	<i>S. hominis</i>	sangre	07/12/2011	HU
25	11564	<i>S. hominis</i>	sangre	05/11/2011	HCG
26	12019	<i>S. hominis</i>	sangre	08/03/2012	HU
27	12020	<i>S. hominis</i>	sangre	08/03/2012	HU
28	12052	<i>S. hominis</i>	sangre	15/03/2012	HCG
29	12053	<i>S. hominis</i>	sangre	15/03/2012	HCG
30	12057	<i>S. hominis</i>	sangre	15/03/2012	HCG
31	12058	<i>S. hominis</i>	LCR	15/03/2012	HCG
32	12062	<i>S. hominis</i>	sangre	15/03/2012	HCG
33	12063	<i>S. hominis</i>	sangre	15/03/2012	HCG
34	12068	<i>S. hominis</i>	sangre	15/03/2012	HCG
35	12096	<i>S. hominis</i>	sangre	22/03/2012	HU
36	12297	<i>S. hominis</i>	sangre	09/05/2012	HU
37	12585	<i>S. hominis</i>	sangre	20/06/2012	HU
38	12702	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2012	HCG
39	12703	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2012	HCG

40		12705	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2012	HCG
41		12706	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2012	HCG
42		12714	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2012	HCG
43		12716	<i>S. hominis</i>	sangre	29/06/2012	HCG
44		12722	<i>S. hominis</i>	LCR	29/06/2012	HU
45		13860	<i>S. hominis</i>	Sangre	10/12/2012	HU
46		13861	<i>S. hominis</i>	Sangre	10/12/2012	HU
47		13898	<i>S. hominis</i>	Sangre	14/12/2012	HU
48		13994	<i>S. hominis</i>	Sangre	04/01/2013	HU
49		14104	<i>S. hominis</i>	Sangre	21/01/2013	HU
50		14182	<i>S. hominis</i>	Sangre	30/01/2013	HU
51		14570	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
52		14572	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
53		14582	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
54		14586	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
55		14601	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
56		14616	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
57		14618	<i>S. hominis</i>	sangre	14/03/2013	HCG
58		14818	<i>S. hominis</i>	sangre	29/03/2013	HU
59		14900	<i>S. hominis</i>	sangre	05/04/2013	HU
60	13	12	<i>S. hominis</i>	sangre	12/04/2013	HU
61	13	215	<i>S. hominis</i>	sangre	07/05/2013	HU
62	13	373	<i>S. hominis</i>	sangre	22/05/2013	HCG
63	13	387	<i>S. hominis</i>	sangre	22/05/2013	HCG
64	13	394	<i>S. hominis</i>	sangre	22/05/2013	HCG
65	13	398	<i>S. hominis</i>	sangre	22/05/2013	HCG
66	13	422	<i>S. hominis</i>	sangre	22/05/2013	HCG
67	13	435	<i>S. hominis</i>	ha	22/05/2013	HCG
68	13	490	<i>S. hominis</i>	sangre	29/05/2013	HU
69	13	563	<i>S. hominis</i>	sangre	06/06/2013	HU
70	13	600	<i>S. hominis</i>	sangre	13/06/2013	HU
71	13	652	<i>S. hominis</i>	sangre	21/06/2013	HU
72	13	696	<i>S. hominis</i>	sangre	27/06/2013	HU
73	13	1117	<i>S. hominis</i>	sangre	05/08/2013	HU
74	13	2087	<i>S. hominis</i>	LCR	06/11/2013	HU
75	13	2118	<i>S. hominis</i>	sangre	08/11/2013	HU
76	13	2237	<i>S. hominis</i>	sangre	21/11/2013	HU
77	13	2282	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG
78	13	2291	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG
79	13	2300	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG
80	13	2305	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG

81	13	2326	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG
82	13	2329	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG
83	13	2336	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HCG
84	13	2374	<i>S. hominis</i>	sangre	22/11/2013	HU
85	13	2517	<i>S. hominis</i>	sangre	10/12/2013	HU
86	13	2518	<i>S. hominis</i>	sangre	10/12/2013	HU
87	14	29	<i>S. hominis</i>	sangre	06/01/2014	HU
88	14	437	<i>S. hominis</i>	sangre	10/02/2014	HU
89	14	779	<i>S. hominis</i>	sangre	11/03/2014	HU
90	14	1349	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HCG
91	14	1350	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HCG
92	14	1354	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HU
93	14	1355	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HU
94	14	1391	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HCG
95	14	1397	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HCG
96	14	1398	<i>S. hominis</i>	sangre	14/05/2014	HCG
97	14	1627	<i>S. hominis</i>	sangre	13/06/2014	HU
98	14	2550	<i>S. hominis</i>	sangre	25/09/2014	HCG
99	14	2552	<i>S. hominis</i>	sangre	25/09/2014	HCG
100	14	2553	<i>S. hominis</i>	sangre	25/09/2014	HCG
101	14	2557	<i>S. hominis</i>	sangre	25/09/2014	HCG
102	14	2558	<i>S. hominis</i>	sangre	25/09/2014	HCG
103	14	2567	<i>S. hominis</i>	sangre	25/09/2014	HCG
104	14	3172	<i>S. hominis</i>	sangre	24/11/2014	HCG
105	14	3175	<i>S. hominis</i>	sangre	24/11/2014	HCG
106	14	3178	<i>S. hominis</i>	sangre	24/11/2014	HCG
107	14	3181	<i>S. hominis</i>	sangre	24/11/2014	HCG
108	14	3185	<i>S. hominis</i>	sangre	24/11/2014	HCG
109	14	3190	<i>S. hominis</i>	sangre	24/11/2014	HCG
110	15	2432	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
111	15	2434	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
112	15	2436	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
113	15	2437	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
114	15	2440	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
115	15	2442	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
116	15	2444	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
117	15	2445	<i>S. hominis</i>	b1	21/09/2015	HCG
118	15	3255	<i>S. hominis</i>	sangre	14/12/2015	HU
119	16	1364	<i>S. hominis</i>	sangre	11/08/2016	HCG
120	16	1636	<i>S. hominis</i>	sangre	30/09/2016	HCG
121	16	1638	<i>S. hominis</i>	sangre	30/09/2016	HCG

122	16	1644	<i>S. hominis</i>	sangre	30/09/2016	HCG
123	16	1652	<i>S. hominis</i>	sangre	30/09/2016	HCG
124	16	1657	<i>S. hominis</i>	sangre	30/09/2016	HCG
125	16	1675	<i>S. hominis</i>	sangre	05/10/2016	HCG
126	16	1677	<i>S. hominis</i>	sangre	05/10/2016	HCG
127	16	1678	<i>S. hominis</i>	sangre	05/10/2016	HCG
128	16	1742	<i>S. hominis</i>	sangre	21/10/2016	HCG
129	16	1776	<i>S. hominis</i>	sangre	21/10/2016	HCG
130	16	1818	<i>S. hominis</i>	sangre	26/10/2016	HCG
131	16	1823	<i>S. hominis</i>	sangre	26/10/2016	HCG
132	16	1913	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
133	16	1915	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
134	16	1917	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
135	16	1918	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
136	16	1921	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
137	16	1922	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
138	16	1923	<i>S. hominis</i>	sangre	10/11/2016	HCG
139	16	1994	<i>S. hominis</i>	sangre	29/11/2016	HCG
140	16	2014	<i>S. hominis</i>	sangre	01/12/2016	HCG
141	16	2086	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
142	16	2087	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
143	16	2088	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
144	16	2091	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
145	16	2092	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
146	16	2093	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
147	16	2110	<i>S. hominis</i>	sangre	08/12/2016	HCG
148	16	2146	<i>S. hominis</i>	sangre	14/12/2016	HCG

B. Nivel de producción de biofilm

Número	DO Planctónicas	DO Biofilm	Relación Bio/Plan	Resultado
1	0.048	2.994	62.382	Fuerte
2	0.181	1.489	8.228	Fuerte
3	0.193	0.584	3.026	Fuerte
4	0.209	0.346	1.656	Fuerte
5	0.204	0.645	3.160	Fuerte
6	0.289	3.501	12.114	Fuerte
7	0.174	0.688	3.954	Fuerte
8	0.204	1.335	6.546	Fuerte
9	0.172	2.519	14.643	Fuerte
10	0.317	0.055	0.175	No productor
11	0.248	0.119	0.478	No productor
12	0.05	0.174	3.487	Débil
13	0.028	0.032	1.155	No productor
14	0.294	0.118	0.400	No productor
15	0.182	0.690	3.789	Fuerte
16	0.078	3.501	44.885	Fuerte
17	0.205	0.216	1.052	Débil
18	0.239	2.104	8.805	Fuerte
19	0.243	0.433	1.781	Fuerte
20	0.192	0.195	1.014	Débil
21	0.296	0.620	2.095	Fuerte
22	0.374	0.259	0.692	Fuerte
23	0.305	0.282	0.926	Fuerte
24	0.131	2.651	20.239	Fuerte
25	0.235	0.275	1.170	Fuerte
26	0.277	0.191	0.690	Débil
27	0.099	2.642	26.684	Fuerte
28	0.312	0.997	3.196	Fuerte
29	0.365	0.257	0.705	Fuerte
30	0.439	0.193	0.439	Débil
31	0.263	0.585	2.224	Fuerte
32	0.394	0.231	0.587	Débil
33	0.349	0.060	0.171	No productor
34	0.332	0.258	0.777	Fuerte
35	0.202	0.898	4.446	Fuerte
36	0.158	0.806	5.099	Fuerte
37	0.266	0.438	1.647	Fuerte
38	0.242	0.095	0.393	No productor
39	0.271	0.240	0.886	Débil

40	0.194	0.408	2.103	Fuerte
41	0.16	2.072	12.952	Fuerte
42	0.211	1.770	8.389	Fuerte
43	0.225	0.787	3.496	Fuerte
44	0.203	0.380	1.874	Fuerte
45	0.222	0.347	1.563	Fuerte
46	0.245	0.272	1.110	Fuerte
47	0.152	1.185	7.794	Fuerte
48	0.285	0.269	0.944	Fuerte
49	0.282	0.063	0.223	No productor
50	0.318	0.147	0.461	Débil
51	0.19	1.738	9.147	Fuerte
52	0.364	0.185	0.509	Débil
53	0.263	0.390	1.482	Fuerte
54	0.152	3.155	20.754	Fuerte
55	0.213	1.819	8.540	Fuerte
56	0.353	0.092	0.259	No productor
57	0.201	0.514	2.556	Fuerte
58	0.24	0.544	2.265	Fuerte
59	0.201	3.474	17.284	Fuerte
60	0.22	0.594	2.702	Fuerte
61	0.196	0.037	0.190	No productor
62	0.256	0.081	0.316	No productor
63	0.061	0.979	16.044	Fuerte
64	0.216	0.029	0.133	No productor
65	0.271	0.092	0.338	No productor
66	0.319	0.025	0.078	No productor
67	0.213	0.395	1.853	Fuerte
68	0.25	0.026	0.103	No productor
69	0.066	1.663	25.192	Fuerte
70	0.189	0.052	0.277	No productor
71	0.187	0.104	0.558	No productor
72	0.134	0.267	1.993	Fuerte
73	0.141	0.265	1.877	Fuerte
74	0.218	0.090	0.414	No productor
75	0.111	1.162	10.468	Fuerte
76	0.206	0.130	0.631	Débil
77	0.13	0.397	3.054	Fuerte
78	0.125	0.341	2.731	Fuerte
79	0.319	0.311	0.974	Fuerte
80	0.179	0.107	0.600	No productor

81	0.148	0.787	5.318	Fuerte
82	0.105	1.178	11.219	Fuerte
83	0.232	0.379	1.634	Fuerte
84	0.223	0.055	0.248	No productor
85	0.197	0.062	0.313	No productor
86	0.226	0.884	3.910	Fuerte
87	0.236	0.053	0.226	No productor
88	0.237	0.061	0.257	No productor
89	0.323	0.058	0.180	No productor
90	0.234	0.024	0.104	No productor
91	0.143	0.767	5.366	Fuerte
92	0.077	1.415	18.381	Fuerte
93	0.116	0.103	0.885	No productor
94	0.189	0.099	0.524	No productor
95	0.14	0.070	0.498	No productor
96	0.163	0.076	0.468	No productor
97	0.107	0.206	1.922	Débil
98	0.084	0.074	0.885	No productor
99	0.197	0.165	0.836	Débil
100	0.115	0.273	2.374	Fuerte
101	0.103	0.147	1.427	Débil
102	0.117	0.163	1.396	Débil
103	0.081	0.756	9.333	Fuerte
104	0.183	0.079	0.432	No productor
105	0.075	0.124	1.653	No productor
106	0.201	0.158	0.784	Débil
107	0.313	0.166	0.530	Débil
108	0.277	0.558	2.013	Fuerte
109	0.253	0.333	1.316	Fuerte
110	0.257	1.291	5.023	Fuerte
111	0.055	3.033	55.152	Fuerte
112	0.232	1.650	7.114	Fuerte
113	0.191	1.689	8.843	Fuerte
114	0.401	0.478	1.191	Fuerte
115	0.301	1.893	6.288	Fuerte
116	0.133	3.218	24.198	Fuerte
117	0.184	2.853	15.507	Fuerte
118	0.208	0.673	3.236	Fuerte
119	0.244	0.334	1.367	Fuerte
120	0.118	1.262	10.692	Fuerte
121	0.113	1.404	12.428	Fuerte

122	0.283	1.154	4.077	Fuerte
123	0.258	1.396	5.410	Fuerte
124	0.102	1.623	15.912	Fuerte
125	0.125	1.035	8.280	Fuerte
126	0.099	0.952	9.616	Fuerte
127	0.306	0.430	1.404	Fuerte
128	0.276	0.547	1.983	Fuerte
129	0.218	0.748	3.431	Fuerte
130	0.362	1.856	5.128	Fuerte
131	0.318	0.591	1.858	Fuerte
132	0.138	0.728	5.278	Fuerte
133	0.127	1.966	15.480	Fuerte
134	0.319	0.219	0.687	Débil
135	0.305	0.226	0.742	Débil
136	0.182	0.063	0.348	No productor
137	0.257	0.288	1.119	Fuerte
138	0.342	0.980	2.865	Fuerte
139	0.061	3.064	50.224	Fuerte
140	0.282	0.440	1.559	Fuerte
141	0.155	2.363	15.243	Fuerte
142	0.107	2.772	25.910	Fuerte
143	0.103	2.356	22.874	Fuerte
144	0.163	1.025	6.288	Fuerte
145	0.199	0.389	1.956	Fuerte
146	0.124	1.172	9.449	Fuerte
147	0.26	0.201	0.773	Débil
148	0.167	0.067	0.399	No productor

C. Composición del biofilm sin antibióticos

Número	Proteinasa K			Meta-peryodato de sodio			DNasa I		
	Promedio	Resultado	% D	Promedio	Resultado	% D	Promedio	Resultado	% D
1	0.116	Fuerte	96.69	2.418	Intermedio	30.93	2.052	Intermedio	41.39
2	0.136	Fuerte	96.00	3.134	Sin desprendimiento	7.57	0.372	Fuerte	89.04
3	0.498	Fuerte	85.79	2.882	Intermedio	17.69	1.190	Moderadamente fuerte	66.01
4	0.534	Fuerte	84.74	2.418	Intermedio	30.94	2.938	Intermedio	16.09
5	0.368	Fuerte	83.78	1.386	Intermedio	38.83	1.826	Intermedio	19.41
6	0.026	Fuerte	99.25	3.370	Sin desprendimiento	3.73	1.264	Moderadamente fuerte	63.91
7	0.428	Fuerte	87.77	2.631	Intermedio	24.84	1.255	Moderadamente fuerte	64.14
8	0.058	Fuerte	98.34	3.501	Sin desprendimiento	0.00	1.222	Moderadamente fuerte	65.09
9	0.079	Fuerte	97.61	2.986	Sin desprendimiento	9.15	1.380	Moderadamente fuerte	58.03
12	0.448	Fuerte	87.19	2.562	Intermedio	26.83	1.996	Intermedio	42.98
15	0.227	Fuerte	93.52	2.042	Intermedio	41.66	2.042	Intermedio	41.66
16	0.087	Fuerte	97.51	1.576	Moderadamente fuerte	54.98	0.043	Fuerte	98.76
17	1.046	Moderadamente fuerte	70.12	3.501	Sin desprendimiento	0.00	0.227	Fuerte	93.52
18	0.003	Fuerte	99.91	3.501	Sin desprendimiento	0.00	0.014	Fuerte	99.59
19	0.122	Fuerte	96.51	3.420	Sin desprendimiento	2.30	0.704	Fuerte	79.89
20	0.100	Fuerte	97.13	3.501	Sin desprendimiento	0.00	2.462	Intermedio	29.68
21	0.097	Fuerte	97.23	2.911	Intermedio	16.85	0.038	Fuerte	98.91
22	0.241	Fuerte	93.13	3.225	Sin desprendimiento	7.89	1.185	Moderadamente fuerte	66.16
23	1.175	Moderadamente fuerte	66.44	3.361	Sin desprendimiento	4.01	2.514	Intermedio	28.18
24	0.232	Fuerte	93.39	3.501	Sin desprendimiento	0.00	0.165	Fuerte	95.30
25	0.284	Fuerte	90.75	2.772	Sin desprendimiento	9.60	1.740	Intermedio	43.25
26	0.493	Fuerte	85.92	3.380	Sin desprendimiento	3.45	2.598	Intermedio	25.79

27	0.586	Fuerte	80.93	3.501	Sin desprendimiento	0.00	3.501	Sin desprendimiento	0.00
28	0.142	Fuerte	90.43	3.169	Sin desprendimiento	9.49	1.442	Sin desprendimiento	3.07
29	0.122	Fuerte	86.72	2.544	Intermedio	27.34	3.085	Intermedio	11.89
30	0.130	Fuerte	94.42	2.204	Sin desprendimiento	5.39	1.230	Intermedio	47.19
31	0.097	Fuerte	93.70	2.828	Intermedio	19.22	1.132	Intermedio	26.66
32	0.075	Fuerte	95.20	2.286	Intermedio	34.70	0.081	Fuerte	94.82
34	0.103	Fuerte	94.18	2.964	Intermedio	15.34	0.568	Moderadamente fuerte	67.80
35	0.357	Fuerte	77.49	1.948	Intermedio	44.36	1.053	Intermedio	33.66
36	0.334	Moderadamente fuerte	68.27	3.501	Sin desprendimiento	0.00	1.308	Moderadamente fuerte	62.65
37	0.124	Fuerte	90.46	3.201	Sin desprendimiento	8.57	3.288	Sin desprendimiento	6.08
39	0.276	Fuerte	82.22	3.501	Sin desprendimiento	0.00	1.549	Sin desprendimiento	0.09
40	0.416	Moderadamente fuerte	72.60	3.183	Sin desprendimiento	9.07	0.033	Fuerte	97.83
41	0.350	Fuerte	89.81	3.250	Sin desprendimiento	5.42	1.136	Moderadamente fuerte	66.94
42	0.526	Fuerte	84.36	2.421	Intermedio	28.01	1.782	Intermedio	47.00
43	0.130	Fuerte	95.06	3.501	Sin desprendimiento	0.00	2.308	Intermedio	12.26
44	0.135	Fuerte	93.43	3.359	Sin desprendimiento	4.06	0.577	Moderadamente fuerte	71.84
45	0.338	Fuerte	87.21	3.220	Sin desprendimiento	8.02	2.264	Intermedio	14.40
46	0.062	Fuerte	97.97	3.501	Sin desprendimiento	0.00	1.257	Moderadamente fuerte	58.98
47	0.405	Fuerte	87.15	3.147	Sin desprendimiento	0.16	2.119	Intermedio	32.79
48	0.072	Fuerte	96.71	3.408	Sin desprendimiento	2.67	0.172	Fuerte	92.09
50	0.312	Fuerte	90.51	3.353	Sin desprendimiento	4.24	1.218	Moderadamente fuerte	63.01
51	0.399	Fuerte	88.61	2.751	Intermedio	21.43	1.375	Moderadamente fuerte	60.72
52	0.010	Fuerte	99.53	0.284	Fuerte	86.05	0.471	Fuerte	76.87
53	0.003	Fuerte	99.88	0.196	Fuerte	93.15	1.895	Intermedio	33.64
54	0.015	Fuerte	99.51	0.083	Fuerte	97.38	2.544	Intermedio	19.36
55	0.048	Fuerte	98.57	2.844	Intermedio	16.16	1.464	Moderadamente fuerte	56.83

57	0.002	Fuerte	99.92	0.510	Fuerte	83.17	1.196	Moderadamente fuerte	60.53
58	0.128	Fuerte	91.83	2.877	Intermedio	17.83	2.242	Intermedio	35.97
59	0.023	Fuerte	99.13	0.130	Fuerte	95.01	3.217	Sin desprendimiento	8.12
60	0.240	Fuerte	93.15	0.654	Fuerte	81.3	3.050	Intermedio	12.89
63	0.127	Fuerte	91.4	0.897	Sin desprendimiento	0.0	0.513	Sin desprendimiento	0.0
67	0.138	Fuerte	96.1	2.294	Intermedio	34.5	2.615	Intermedio	25.3
69	0.275	Fuerte	92.1	2.383	Intermedio	31.9	2.019	Intermedio	42.3
72	0.156	Fuerte	95.5	1.414	Moderadamente fuerte	59.6	1.613	Moderadamente fuerte	53.9
73	0.135	Fuerte	95.2	1.857	Intermedio	34.1	1.271	Moderadamente fuerte	54.9
75	0.109	Fuerte	96.2	1.527	Intermedio	47.1	0.562	Fuerte	80.5
76	0.353	Fuerte	89.9	1.249	Moderadamente fuerte	64.3	0.171	Fuerte	95.1
77	0.097	Fuerte	96.9	2.780	Intermedio	11.5	1.612	Intermedio	48.7
78	0.058	Fuerte	98.3	3.188	Sin desprendimiento	8.9	3.164	Sin desprendimiento	9.6
79	0.099	Fuerte	95.9	1.613	Intermedio	33.4	3.355	Sin desprendimiento	0.0
81	0.123	Fuerte	94.8	1.810	Intermedio	22.8	2.439	Sin desprendimiento	0.0
82	0.035	Fuerte	91.8	0.522	Sin desprendimiento	0.0	0.200	Moderadamente fuerte	52.5
83	0.067	Fuerte	97.6	1.436	Intermedio	48.8	3.308	Sin desprendimiento	0.0
86	0.232	Fuerte	91.9	2.681	Sin desprendimiento	6.5	2.182	Intermedio	23.9
91	0.131	Fuerte	96.2	2.960	Intermedio	15.5	0.714	Fuerte	79.6
92	0.168	Fuerte	95.2	2.783	Intermedio	20.5	2.199	Intermedio	37.2
97	0.117	Fuerte	95.8	0.786	Moderadamente fuerte	71.4	1.594	Intermedio	42.0
99	0.165	Fuerte	95.3	1.089	Moderadamente fuerte	68.9	3.005	Intermedio	14.2
100	0.166	Fuerte	93.8	1.378	Intermedio	48.4	1.394	Intermedio	47.8
101	0.055	Fuerte	98.4	1.762	Intermedio	48.9	2.202	Intermedio	36.1
102	0.049	Fuerte	96.9	0.776	Sin desprendimiento	0.0	0.440	Moderadamente fuerte	71.7
103	0.123	Fuerte	96.5	1.608	Moderadamente fuerte	54.1	2.803	Intermedio	19.9

106	0.003	Fuerte	99.9	0.937	Moderadamente fuerte	56.5	1.286	Intermedio	40.3
107	1.423	Moderadamente fuerte	59.4	2.117	Intermedio	39.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0
108	0.345	Fuerte	90.1	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
109	0.521	Fuerte	85.1	3.160	Sin desprendimiento	9.7	3.334	Sin desprendimiento	4.8
110	0.537	Fuerte	84.7	3.501	Sin desprendimiento	0.0	1.806	Intermedio	48.4
111	0.570	Fuerte	83.7	3.501	Sin desprendimiento	0.0	1.851	Intermedio	47.1
112	0.526	Fuerte	85.0	3.316	Sin desprendimiento	5.3	3.445	Sin desprendimiento	1.6
113	0.501	Fuerte	85.7	3.501	Sin desprendimiento	0.0	0.733	Fuerte	79.1
114	0.473	Fuerte	86.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.821	Intermedio	19.4
115	1.142	Moderadamente fuerte	67.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.006	Intermedio	42.7
116	0.150	Fuerte	95.63	3.345	Sin desprendimiento	2.67	0.427	Fuerte	87.56
117	1.215	Moderadamente fuerte	65.3	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.114	Intermedio	39.6
118	0.367	Fuerte	89.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.287	Intermedio	34.7
119	0.528	Fuerte	83.6	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
120	0.003	Fuerte	99.7	0.372	Moderadamente fuerte	59.9	0.509	Intermedio	45.2
121	1.072	Moderadamente fuerte	69.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
122	0.455	Fuerte	87.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0	1.308	Moderadamente fuerte	62.6
123	0.826	Fuerte	76.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	0.459	Fuerte	86.9
124	0.791	Fuerte	77.4	3.150	Sin desprendimiento	10.0	2.696	Intermedio	23.0
125	0.469	Fuerte	86.6	1.338	Moderadamente fuerte	61.8	2.918	Intermedio	16.7
126	0.900	Moderadamente fuerte	74.3	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.157	Intermedio	38.4
127	0.196	Fuerte	94.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.164	Intermedio	38.2
128	0.237	Fuerte	93.2	3.313	Sin desprendimiento	5.4	0.742	Fuerte	78.8
129	0.562	Fuerte	83.9	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.269	Sin desprendimiento	6.6
130	0.002	Fuerte	99.9	0.253	Fuerte	80.2	0.363	Moderadamente fuerte	71.6
131	0.004	Fuerte	99.9	0.813	Fuerte	76.8	0.199	Fuerte	94.3

132	0.138	Fuerte	97.6	2.294	Intermedio	34.5	2.615	Intermedio	25.3
133	0.033	Fuerte	98.6	1.216	Intermedio	46.6	2.256	Sin desprendimiento	1.0
134	0.006	Fuerte	99.8	0.868	Moderadamente fuerte	68.9	1.729	Intermedio	38.1
135	0.005	Fuerte	99.8	0.875	Moderadamente fuerte	68.7	1.812	Intermedio	35.2
137	0.001	Fuerte	99.9	0.480	Moderadamente fuerte	66.3	1.262	Intermedio	11.3
138	0.005	Fuerte	99.6	0.767	Intermedio	38.2	0.218	Fuerte	82.4
139	0.002	Fuerte	99.9	0.796	Intermedio	47.8	1.367	Fuerte	10.4
140	0.004	Fuerte	99.9	0.628	Fuerte	82.1	0.488	Fuerte	86.1
141	0.275	Fuerte	95.1	2.383	Intermedio	31.9	2.019	Intermedio	42.3
142	0.004	Fuerte	99.9	2.807	Intermedio	19.8	2.024	Intermedio	42.2
143	0.117	Fuerte	95.8	0.786	Moderadamente fuerte	71.4	1.594	Intermedio	42.0
144	0.005	Fuerte	99.8	0.916	Moderadamente fuerte	54.5	0.894	Moderadamente fuerte	55.6
145	0.003	Fuerte	99.9	0.868	Moderadamente fuerte	73.8	0.776	Fuerte	76.6
146	0.003	Fuerte	99.9	1.593	Moderadamente fuerte	53.7	0.590	Fuerte	82.8
147	0.002	Fuerte	99.9	0.877	Moderadamente fuerte	55.7	0.719	Moderadamente fuerte	63.7

D. Composición del biofilm con LZD

Número	Proteinasa K			Meta-peryodato de sodio			DNasa I		
	Promedio	Resultado	% Desp	Promedio	Resultado	% Desp	Promedio	Resultado	% Desp
60	0.234	Fuerte	93.3	1.196	Moderadamente fuerte	65.8	3.501	Sin desprendimiento	0.0
63	0.266	Fuerte	92.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
67	0.255	Fuerte	92.7	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
69	0.162	Fuerte	95.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
72	0.275	Fuerte	92.1	2.865	Intermedio	18.2	3.501	Sin desprendimiento	0.0
73	0.254	Fuerte	92.8	2.990	Intermedio	14.6	3.501	Sin desprendimiento	0.0
75	0.274	Fuerte	92.2	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
76	0.752	Moderadamente fuerte	74.7	1.980	Intermedio	33.4	1.371	Moderadamente fuerte	53.9
77	0.237	Fuerte	93.2	1.626	Moderadamente fuerte	53.6	2.417	Intermedio	31.0
78	0.224	Fuerte	93.6	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
79	0.175	Fuerte	95.0	2.719	Intermedio	22.3	3.501	Sin desprendimiento	0.0
81	0.390	Fuerte	88.9	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
82	0.142	Fuerte	95.9	2.900	Intermedio	17.2	1.773	Intermedio	49.4
83	0.259	Fuerte	92.6	2.689	Intermedio	23.2	3.501	Sin desprendimiento	0.0
86	0.205	Fuerte	94.1	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.104	Intermedio	11.3
91	0.543	Fuerte	84.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
92	0.739	Fuerte	78.9	3.501	Sin desprendimiento	0.0	1.486	Moderadamente fuerte	57.6
97	0.492	Fuerte	85.9	2.627	Intermedio	25.0	2.444	Intermedio	30.2
99	0.350	Fuerte	90.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
100	0.377	Fuerte	89.2	3.448	Sin desprendimiento	1.5	3.243	Sin desprendimiento	7.4
101	0.174	Fuerte	95.0	2.384	Intermedio	31.9	2.765	Intermedio	21.0
102	0.209	Fuerte	94.0	2.958	Intermedio	15.5	1.065	Moderadamente fuerte	69.6

103	0.118	Fuerte	96.6	1.488	Moderadamente fuerte	57.5	2.943	Intermedio	15.9
107	0.888	Moderadamente fuerte	74.6	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
108	0.503	Fuerte	85.6	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
109	0.591	Fuerte	83.1	1.741	Intermedio	50.3	3.501	Sin desprendimiento	0.0
110	0.425	Fuerte	87.9	1.668	Moderadamente fuerte	52.4	1.592	Moderadamente fuerte	54.5
111	0.498	Fuerte	85.8	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.137	Sin desprendimiento	10.4
112	0.368	Fuerte	89.5	3.356	Sin desprendimiento	4.1	3.501	Sin desprendimiento	0.0
113	0.335	Fuerte	90.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	1.328	Moderadamente fuerte	62.1
114	0.133	Fuerte	96.2	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.340	Sin desprendimiento	4.6
115	0.957	Moderadamente fuerte	72.7	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.379	Sin desprendimiento	3.5
117	0.487	Fuerte	86.1	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.534	Intermedio	27.6
118	0.618	Fuerte	82.4	3.357	Sin desprendimiento	4.1	2.278	Intermedio	34.9
119	0.535	Fuerte	84.7	3.289	Sin desprendimiento	6.1	3.396	Sin desprendimiento	3.0
121	0.352	Fuerte	89.9	2.945	Intermedio	15.9	3.274	Sin desprendimiento	6.5
122	0.110	Fuerte	96.9	3.441	Sin desprendimiento	1.7	0.894	Moderadamente fuerte	74.5
123	0.475	Fuerte	86.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0	1.935	Intermedio	44.7
124	1.197	Moderadamente fuerte	65.8	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.640	Intermedio	24.6
125	0.676	Fuerte	80.7	2.963	Intermedio	15.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0
126	0.634	Fuerte	81.9	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.086	Intermedio	11.8
127	0.739	Fuerte	78.9	2.989	Intermedio	14.6	2.298	Intermedio	34.4
128	0.168	Fuerte	95.2	2.981	Intermedio	14.8	1.945	Intermedio	44.5
129	0.491	Fuerte	86.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.845	Intermedio	18.7

E. Composición del biofilm con VAN

Número	Proteínasa K			Meta-peryodato de sodio			DNasa I		
	Promedio	Resultado	% Desp	Promedio	Resultado	% Desp	Promedio	Resultado	% Desp
60	0.164	Fuerte	95.3	2.200	Intermedio	37.2	2.992	Intermedio	14.5
63	0.356	Fuerte	83.2	1.698	Intermedio	19.9	1.609	Intermedio	24.1
67	0.140	Fuerte	95.8	2.969	Intermedio	11.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0
69	0.791	Moderadamente fuerte	74.9	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.448	Sin desprendimiento	0.0
72	0.102	Fuerte	96.1	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
73	0.184	Fuerte	94.4	2.739	Intermedio	16.3	2.868	Intermedio	12.4
75	0.147	Fuerte	95.8	2.974	Intermedio	15.1	2.779	Intermedio	20.6
76	0.155	Fuerte	95.2	2.949	Sin desprendimiento	9.6	0.256	Fuerte	92.1
77	0.098	Fuerte	97.2	2.152	Intermedio	38.5	2.096	Intermedio	40.1
78	0.145	Fuerte	95.8	2.432	Intermedio	30.5	3.020	Intermedio	13.7
79	0.087	Fuerte	93.3	2.285	Sin desprendimiento	0.0	3.239	Sin desprendimiento	0.0
81	0.110	Fuerte	91.2	2.350	Sin desprendimiento	0.0	2.828	Sin desprendimiento	0.0
82	0.061	Fuerte	89.0	0.543	Sin desprendimiento	1.7	0.636	Sin desprendimiento	0.0
83	0.135	Fuerte	92.3	2.726	Sin desprendimiento	0.0	3.354	Sin desprendimiento	0.0
86	0.142	Fuerte	96.0	3.209	Sin desprendimiento	8.3	3.382	Sin desprendimiento	3.4
91	0.212	Fuerte	94.0	3.418	Sin desprendimiento	2.4	3.501	Sin desprendimiento	0.0
92	0.222	Fuerte	93.7	3.501	Sin desprendimiento	0.0	2.354	Intermedio	32.8
97	0.110	Fuerte	95.7	2.117	Intermedio	17.7	2.784	Sin desprendimiento	0.0
99	0.077	Fuerte	97.0	2.264	Intermedio	12.4	2.328	Sin desprendimiento	9.9
100	0.068	Fuerte	92.8	1.850	Sin desprendimiento	0.0	0.936	Sin desprendimiento	0.4
101	0.071	Fuerte	97.8	2.405	Intermedio	25.6	2.259	Intermedio	30.1
102	0.094	Fuerte	92.8	1.160	Intermedio	11.7	1.062	Intermedio	19.1

103	0.084	Fuerte	97.6	1.409	Moderadamente fuerte	59.8	2.625	Intermedio	25.0
106	0.127	Fuerte	96.1	1.126	Moderadamente fuerte	65.2	3.040	Sin desprendimiento	6.1
108	0.416	Fuerte	87.8	3.356	Sin desprendimiento	1.1	2.666	Intermedio	21.5
109	0.706	Fuerte	79.8	3.203	Sin desprendimiento	8.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0
110	0.320	Fuerte	90.6	3.501	Intermedio	15.2	3.006	Intermedio	12.0
111	1.259	Moderadamente fuerte	63.7	3.032	Intermedio	12.6	2.258	Intermedio	34.9
112	0.112	Fuerte	96.5	1.720	Intermedio	46.6	3.501	Sin desprendimiento	0.0
113	0.477	Fuerte	86.4	3.402	Sin desprendimiento	2.8	1.779	Intermedio	49.2
114	0.989	Moderadamente fuerte	69.9	2.895	Intermedio	11.8	3.501	Intermedio	18.1
115	0.705	Fuerte	79.9	3.418	Sin desprendimiento	2.4	3.256	Sin desprendimiento	7.0
116	0.690	Fuerte	80.3	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.501	Sin desprendimiento	0.0
117	0.544	Fuerte	84.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.416	Sin desprendimiento	2.4
118	0.645	Fuerte	76.6	3.337	Intermedio	15.1	2.263	Intermedio	17.9
119	0.330	Fuerte	83.8	2.925	Intermedio	15.8	2.615	Intermedio	13.7
120	0.356	Fuerte	86.3	2.005	Intermedio	23.2	3.423	Sin desprendimiento	7.5
121	0.181	Fuerte	89.5	2.018	Intermedio	30.5	3.501	Sin desprendimiento	0.0
122	0.217	Fuerte	93.7	2.238	Intermedio	35.5	2.729	Intermedio	21.3
123	0.317	Fuerte	90.9	1.924	Intermedio	45.1	3.102	Intermedio	11.4
124	2.597	Intermedio	25.8	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.475	Sin desprendimiento	0.7
125	0.767	Fuerte	77.5	2.105	Intermedio	38.1	3.451	Sin desprendimiento	0.0
126	1.706	Moderadamente fuerte	51.3	3.501	Sin desprendimiento	0.0	3.351	Sin desprendimiento	4.3
127	0.104	Fuerte	96.5	1.765	Intermedio	40.1	3.014	Sin desprendimiento	3.4
128	0.155	Fuerte	94.7	2.131	Intermedio	26.7	3.156	Sin desprendimiento	0.0
129	1.234	Moderadamente fuerte	64.2	3.501	Sin desprendimiento	8.3	2.612	Intermedio	24.2
130	2.115	Intermedio	39.6	3.285	Sin desprendimiento	6.2	3.383	Sin desprendimiento	3.4

F. Susceptibilidad a los antibióticos Parte 1

#	<i>mecA</i>	OXA		ERI				SXT				CLI				LZD				VAN					
		Planctónicas	Biofilm																						
		CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP												
1	+	≥1	R			≥8	R			≤1/19	S			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
2	+	≥1	R			≥8	R			8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
3	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
4	-	≤12	S			≥8	R			≤1/19	S			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
5	-	≤12	S			≤5	S			≤1/19	S			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
6	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
7	-	0.25	S			≥8	R			≤1/19	S			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
8	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
9	-	0.25	S			≤5	S			≤1/19	S			≤5	S			≤2	S			≤4	S		
10	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
11	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
12	+	≥1	R			≥8	R			4/76	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
13	+	≥1	R			≥8	R			≤1/19	S			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
14	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
15	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
16	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
17	+	≥1	R			≥8	R			≥8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
18	-	0.25	S			≤5	S			≤1/19	S			≥4	R			≤2	S			≤4	S		
19	+	≥1	R			≥8	R			8/152	R			≥4	R			≤2	S			≤4	S		

20	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 2	S
21	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
22	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
23	-	≤ 12	S	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
24	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
25	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
26	-	0.25	S	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
27	+	0.5	R	≤ 5	S	8/152	R	4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
28	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
29	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
30	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
31	+	≥ 16	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
32	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
33	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
34	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
35	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
36	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
37	-	0.25	S	≤ 5	S	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
38	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
39	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
40	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
41	+	16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
42	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
43	+	≥ 16	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
44	+	≥ 16	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
45	-	0.25	S	≤ 5	S	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S

46	+	≥ 1	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
47	-	≤ 12	S		≤ 5	S		$\leq 1/19$	S		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
48	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
49	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
50	+	≥ 16	R		≥ 8	R		4/76	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
51	+	≥ 16	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
52	+	≥ 16	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
53	+	≥ 16	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
54	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
55	+	2	R		≤ 5	S		8/152	R		4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
56	+	≥ 1	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
57	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\leq 1/19$	S		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
58	+	1	R		≥ 8	R		$\leq 1/19$	S		4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
59	+	≥ 1	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
60	+	16	R	32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	.12/2.3	S	16/304	R	64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
61	+	16	R	16	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/608	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
62	+	≥ 1	R	32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	4/76	R	32/609	R	≥ 64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
63	+	2	R	16	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/608	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
64	+	≥ 16	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
65	+	≥ 16	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
66	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
67	+	1	R	32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	4/76	R	32/609	R	≥ 64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
68	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
69	+	2	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	.5/95	S	32/610	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
70	+	≥ 16	R		≥ 8	R		$\geq 8/152$	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
71	+	≥ 1	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							

72	+	≥ 16	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/611	R	64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
73	+	16	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/612	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
74	+	≥ 16	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
75	+	1	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	.12/2.3	S	32/613	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
76	+	1	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	.12/2.3	S	32/614	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
77	+	1	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	16/304	R	32/615	R	64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
78	+	16	R	32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/616	R	≥ 64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
79	+	16	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/617	R	64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
80	+	≥ 16	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
81	+	≥ 1	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/618	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
82	+	1	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/619	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
83	+	16	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/620	R	64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
84	+	≥ 16	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
85	+	≥ 16	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
86	-	≤ 12	S	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	16/304	R	32/621	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
87	+	≥ 1	R			≥ 8	R			8/152	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
88	+	≥ 16	R			≥ 8	R			8/152	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
89	+	≥ 1	R			≥ 8	R			8/152	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
90	+	≥ 1	R			≥ 8	R			8/152	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
91	+	≥ 1	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
92	+	16	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	.12/2.3	S	32/623	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
93	-	0.25	S			≤ 5	S			$\leq 1/19$	S			≤ 5	S			≤ 2	S			≤ 4	S		
94	+	≥ 1	R			≥ 8	R			8/152	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
95	+	≥ 1	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
96	+	≥ 1	R			≥ 8	R			$\geq 8/152$	R			≥ 4	R			≤ 2	S			≤ 4	S		
97	-	0.25	S	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	.12/2.3	S	32/624	R	1	I	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R

98	+	≥ 1	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
99	+	8	R	32 R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/625	R	≥ 64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R	
100	+	4	R	≥ 32	R	≥ 64	R	≥ 256	R	8/152	R	32/626	R	64	R	256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 2	S	≥ 512	R
101	+	≥ 1	R		≥ 64	R		16/304	R		0.5	S		≤ 2	S		≤ 2	S							
102	+	16	R		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
103	-	≤ 12	S		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
104	+	≥ 1	R		64	R		4/76	R		0.5	S		≤ 2	S		16	S							
105	-	≤ 12	S		64	R		8/152	R		64	R		2	S		2	S							
106	-	0.12	S		64	R		4/76	R		0.5	S		≤ 2	S		16	S							
107	+	8	R		64	R		8/152	R		64	R		2	S		2	S							
108	+	1	R		16	R		.12/2.3	S		0.5	S		2	S		8	S							
109	-	≤ 12	S		64	R		1/19	S		4	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
110	+	2	R		64	R		.12/2.3	S		0.5	S		≤ 2	S		≤ 2	S							
111	+	≥ 1	R		1	I		16/304	R		0.5	S		≤ 2	S		≤ 2	S							
112	+	2	R		64	R		16/304	R		64	R		2	S		≤ 2	S							
113	+	≥ 1	R		≥ 8	R		8/152	R		≥ 4	R		≤ 2	S		≤ 4	S							
114	+	16	R		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		2	S		≤ 2	S							
115	+	8	R		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
116	+	0.5	R		≥ 64	R		4/76	R		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
117	+	0.5	R		≥ 64	R		1/19	S		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
118	+	16	R		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		2	S		≤ 2	S							
119	+	16	R		≥ 64	R		1/19	S		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
120	+	16	R		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		2	S		≤ 2	S							
121	+	16	R		≥ 64	R		16/304	R		≥ 64	R		≤ 2	S		≤ 2	S							
122	-	0.12	S		8	R		.12/2.3	S		0.5	S		2	S		≤ 2	S							
123	-	0.25	S		≥ 8	R		$\leq 1/19$	S		≤ 5	S		≤ 2	S		≤ 4	S							

124	-	0.25	S	≤ 5	S	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
125	-	0.25	S	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
126	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
127	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	8	R	≤ 4	S
128	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	8	R	≤ 4	S
129	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
130	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
131	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	8	R	≤ 4	S
132	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
133	-	0.25	S	≤ 5	S	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
134	+	1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
135	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
136	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
137	-	0.12	S	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
138	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	8	R	≤ 4	S
139	+	≥ 1	R	≤ 5	S	2/38	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
140	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	8	R	≤ 4	S
141	-	0.25	S	≥ 8	R	4/76	R	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
142	-	0.25	S	≤ 5	S	$\leq 1/19$	S	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
143	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
144	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
145	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S
146	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\geq 8/152$	R	≤ 5	S	≤ 2	S	≤ 4	S
147	+	≥ 1	R	≥ 8	R	$\leq 1/19$	S	≥ 4	R	4	S	8	S
148	+	≥ 1	R	≥ 8	R	8/152	R	≥ 4	R	≤ 2	S	≤ 4	S

G. Susceptibilidad a los antibióticos Parte 2

#	TET				AZM				CIP				GEN				CLO				RIF			
	Planctónicas		Biofilm		Planctónicas		Biofilm		Planctónicas		Biofilm		Planctónicas		Biofilm		Planctónicas		Biofilm		Planctónicas		Biofilm	
	CMi	INTP	CMEB	INTP																				
1	≤4	S			≥16	R			≥8	R			≥32	R			≥32	R			≤1	S		
2	≤4	S			≥16	R			4	R			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
3	32	R			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
4	≤4	S			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
5	≤4	S			≤2	S			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
6	≤4	S			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
7	32	R			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
8	≤4	S			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
9	≤4	S			≤2	S			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
10	≤4	S			≥16	R			≥8	R			≤4	S			≥32	R			≤1	S		
11	≥32	R			≥16	R			4	R			≤4	S			≥32	R			≤1	S		
12	≥32	R			≥16	R			2	I			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
13	≤4	S			≥16	R			≥8	R			32	R			≥32	R			≤1	S		
14	≥32	R			≥16	R			≥8	R			8	I			≤8	S			≤1	S		
15	≤4	S			≥16	R			≥8	R			32	R			≥32	R			4	R		
16	≤4	S			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
17	≤4	S			≥16	R			≥8	R			≤4	S			≤8	S			≤1	S		
18	≤4	S			≤2	S			≤1	S			≤4	S			≤8	S			2	I		
19	≤4	S			≥16	R			≥8	R			8	I			≥32	R			≤1	S		
20	≤4	S			≥16	R			≤1	S			32	R			≥32	R			2	I		
21	≥32	R			≥16	R			≤1	S			≤4	S			≤8	S			4	R		

22	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
23	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
24	32	R	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≤ 8	S	2	I
25	≥ 32	R	≥ 16	R	≤ 1	S	32	R	≥ 32	R	≥ 4	R
26	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≥ 32	R	≤ 1	S
27	≤ 4	S	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
28	≥ 32	R	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≤ 8	S	≤ 1	S
29	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	16	R	≥ 32	R	≤ 1	S
30	8	I	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≤ 8	S	≤ 1	S
31	32	R	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≥ 32	R	2	I
32	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	16	I	≤ 1	S
33	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
34	32	R	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≥ 32	R	≤ 1	S
35	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	32	R	≤ 1	S
36	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
37	≤ 4	S	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
38	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
39	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	16	I	≤ 1	S
40	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
41	≥ 32	R	16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	16	I	≤ 1	S
42	≥ 32	R	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≤ 8	S	≤ 1	S
43	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≤ 8	S	≤ 1	S
44	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	2	I
45	≤ 4	S	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
46	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	32	R	32	R	≤ 1	S
47	≤ 4	S	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S

48	≤ 4	S		≥ 16	R		≤ 1	S		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
49	≥ 32	R		≥ 16	R		≥ 8	R		8	I		16	I		2	I							
50	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
51	≥ 32	R		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		32	R		≥ 4	R							
52	32	R		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
53	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
54	32	R		≥ 16	R		≥ 8	R		8	I		≤ 8	S		≤ 1	S							
55	≤ 4	S		≤ 2	S		≤ 1	S		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
56	≤ 4	S		≥ 16	R		8	R		≥ 32	R		16	I		2	I							
57	≤ 4	S		16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
58	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		8	I		8	S		≤ 1	S							
59	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		8	I		8	S		≤ 1	S							
60	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	32	R	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	32	R	≥ 512	R	2	I	16	R
61	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	64	R
62	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	32	R	≥ 256	R	≤ 2	S	256	R	≤ 4	S	≥ 512	R	2	I	64	R
63	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	64	R
64	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
65	≥ 32	R		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≥ 32	R		4	R							
66	≥ 32	R		≥ 16	R		≥ 8	R		16	R		16	I		2	I							
67	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	32	R	≥ 256	R	≤ 2	S	256	R	≤ 4	S	≥ 512	R	2	I	64	R
68	16	R		≥ 16	R		≥ 8	R		32	R		≥ 32	R		2	I							
69	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	64	R
70	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
71	≤ 4	S		≥ 16	R		≥ 8	R		≤ 4	S		≤ 8	S		≤ 1	S							
72	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	128	R
73	≥ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	32	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	32	R

74	≥ 32	R			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		16	I		4	R				
75	≤ 2	S	≥ 512	R	2	S	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	16	R
76	≤ 2	S	≥ 512	R	2	S	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	≥ 256	R
77	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	64	R
78	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	16	R	≥ 256	R	≤ 2	S	16	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	≥ 256	R
79	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	128	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	≥ 256	R
80	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		16	I				≥ 4	R		
81	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	128	R
82	≤ 2	S	≥ 512	R	2	S	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	256	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	≥ 256	R
83	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	≥ 256	R
84	8	I			≥ 16	R			≥ 8	R			8	I		16	I				2	I		
85	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		≥ 8	S				≤ 1	S		
86	≤ 2	S	≥ 512	R	2	S	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	8	R
87	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		≥ 8	S				≤ 1	S		
88	≥ 32	R			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		≥ 8	S				2	I		
89	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			16	R		16	I				≤ 1	S		
90	32	R			≥ 16	R			≥ 8	R			16	R		16	I				≤ 1	S		
91	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			8	I		≥ 8	S				≤ 1	S		
92	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 16	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	128	R
93	≤ 4	S			≤ 2	S			≤ 1	S			≤ 4	S		≥ 8	S				≤ 1	S		
94	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			8	I		≥ 8	S				≤ 1	S		
95	≥ 32	R			≥ 16	R			≥ 8	R			≥ 32	R		≥ 8	S				≤ 1	S		
96	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		16	I				≥ 4	R		
97	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 1	S	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	32	R
98	≤ 4	S			≥ 16	R			≥ 8	R			≤ 4	S		≥ 32	R				≤ 1	S		
99	≤ 2	S	≥ 512	R	128	R	256	R	≤ 1	S	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	≥ 256	R

100	≤ 2	S	≥ 512	R	≥ 128	R	256	R	16	R	≥ 256	R	≤ 2	S	≥ 512	R	≤ 4	S	≥ 512	R	≤ 1	S	128	R
101	64	R			32	R			≤ 1	S			2	S			≤ 4	S			≤ 1	S		
102	64	R			128	R			≤ 1	S			8	I			16	I			≤ 1	S		
103	2	S			128	R			64	R			2	S			16	I			1	S		
104	2	S			128	R			1	S			2	S			4	S			2	I		
105	2	S			128	R			1	S			2	S			4	S			2	I		
106	2	S			128	R			1	S			2	S			4	S			2	I		
107	2	S			128	R			1	S			2	S			4	S			2	I		
108	2	S			1	S			≤ 1	S			2	S			8	S			≤ 1	S		
109	2	S			≥ 128	R			≤ 1	S			8	I			32	R			≤ 1	S		
110	64	R			≥ 128	R			≤ 1	S			2	S			26	I			1	S		
111	64	R			32	R			≤ 1	S			2	S			4	S			≤ 1	S		
112	64	R			128	R			32	R			4	S			16	I			≤ 1	S		
113	≤ 4	S			≥ 16	R			8	R			8	I			≤ 8	S			2	I		
114	16	R			≥ 128	R			2	I			16	R			16	I			64	R		
115	64	R			≥ 128	R			4	R			≤ 2	S			64	R			≤ 1	S		
116	2	S			≥ 128	R			1	S			≤ 2	S			16	I			≤ 1	S		
117	2	S			≥ 128	R			≤ 1	S			≤ 2	S			16	I			≤ 1	S		
118	2	S			≥ 128	R			32	R			≤ 2	S			16	I			≤ 1	S		
119	8	I			≥ 128	R			32	R			≤ 2	S			≥ 128	R			1	S		
120	2	S			≥ 128	R			≥ 128	R			≤ 2	S			32	R			≤ 1	S		
121	64	R			≥ 128	R			128	R			≤ 2	S			≥ 128	R			≤ 1	S		
122	2	S			≤ 1	S			≤ 1	S			≤ 2	S			8	S			≤ 1	S		
123	16	R			≥ 16	R			≤ 1	S			≤ 4	S			≤ 8	S			≤ 1	S		
124	2	S			≤ 1	S			≤ 1	S			≤ 4	S			16	I			≤ 1	S		
125	≤ 4	S			≥ 16	R			≤ 1	S			8	I			≤ 8	S			≤ 1	S		

126	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	16	R	≤ 8	S	≤ 1	S
127	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≥ 32	R	≤ 1	S
128	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≥ 32	R	≤ 1	S
129	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	16	R	≤ 8	S	≤ 1	S
130	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	16	R	≥ 32	R	≤ 1	S
131	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≥ 32	R	≤ 1	S
132	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
133	32	R	≤ 2	S	≤ 1	S	8	I	≤ 8	S	≤ 1	S
134	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
135	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≤ 8	S	≥ 4	R
136	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
137	≤ 4	S	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
138	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	8	I	≥ 32	R	≤ 1	S
139	≤ 4	S	≤ 2	S	≤ 1	S	16	R	16	I	≤ 1	S
140	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	16	R	≥ 32	R	≥ 4	R
141	32	R	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
142	≤ 4	S	≤ 2	S	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
143	32	R	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
144	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≥ 32	R	≤ 1	S
145	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	≤ 4	S	≥ 32	R	≤ 1	S
146	32	R	≥ 16	R	≤ 1	S	≤ 4	S	≤ 8	S	≤ 1	S
147	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	16	R	≥ 32	R	4	R
148	≤ 4	S	≥ 16	R	≥ 8	R	16	R	≤ 8	S	≤ 1	S

H. Análisis estadístico

Proteínas

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin antibiótico	43	3834.164491	89.16661606	73.19966741
LZD	43	3799.293788	88.35566948	48.70822761
VAN	43	3730.365721	86.75269118	202.9453633

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	129.7769687	2	64.88848435	0.59924119	0.550785844	3.068100269
Dentro de los grupos	13643.83685	126	108.2844194			
Total	13773.61382	128				

Carbohidratos

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin antibiótico	43	904.5617451	21.03631965	651.3797134
LZD	43	559.0798981	13.0018581	342.4041159
VAN	43	674.2618067	15.68050713	251.7651918

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1439.245274	2	719.6226368	1.733266113	0.180892626	3.068100269
Dentro de los grupos	52313.05889	126	415.1830071			
Total	53752.30416	128				

ADN

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin antibiótico	43	1516.779831	35.27394956	772.2757615
LZD	43	807.5240557	18.7796292	521.0567834
VAN	43	580.4537711	13.49892491	315.2902835

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	11095.43534	2	5547.717672	10.34621213	6.9129E-05	3.068100269
Dentro de los grupos	67562.15879	126	536.2076095			
Total	78657.59414	128				

Comparaciones múltiples para ADN. Prueba Dunnet

Variable dependiente: Concentración subinhibitoria

t de Dunnet (bilateral)

(I)Tratamiento	(J)Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
LZD	Sin antibiótico	-16.4905*	4.99369	.002	-27.6621	-5.3188
VAN	Sin antibiótico	-21.7788*	4.99369	.000	-32.9505	-10.6072

El término de error es la media cuadrática(Error) = 536.145.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.