

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE BIOPELÍCULA Y SU PAPEL EN LA
RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN LOS ESTAFILOCOCOS COAGULASA
NEGATIVOS CAUSANTES DE BACTERIEMIAS

POR

EDITH JESSICA DELGADO HERNÁNDEZ

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

2022

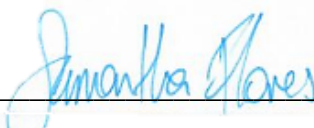
ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE BIOPELÍCULA Y SU PAPAEL EN LA
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN ESTAFILOCOCOS COAGULASA
NEGATIVOS CAUSANTES DE BACTERIEMIAS

Comité de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Secretario



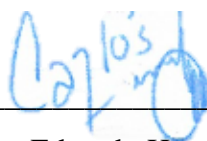
Dra. Claudia Plata Hipólito

Vocal



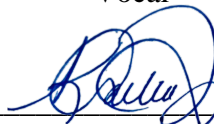
Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Vocal



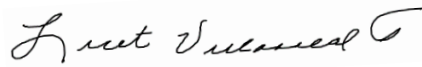
DIRRECCIÓN
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado

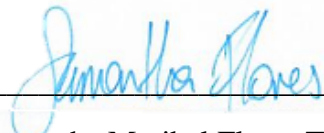
ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE BIOPELÍCULA Y SU PAPAEL EN LA
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN ESTAFILOCOCOS COAGULASA
NEGATIVOS CAUSANTES DE BACTERIEMIAS

Dirección de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño

Director



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Director externo

DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

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 aceptarme como su tesista y siempre brindarme su confianza. Por su apoyo incondicional, motivación y por compartirme su gran experiencia.

A la **Dra. Samantha Maribel Flores Treviño** por todo su apoyo, tiempo y paciencia, por sus consejos y enseñanzas, por todo mil gracias.

A la **Dra. Claudia Plata Hipólito, Dr. Juan F. Contreras Cordero y el Dr. Carlos Hernández Luna** por formar parte del comité de este trabajo, su apoyo y colaboración.

A la **Dra. Paola Bocanegra Ibarias y el Dr. Daniel Salas Treviño** por todo su apoyo y por compartir su conocimiento y experiencia conmigo.

A mis amigos y compañeros de posgrado: **Edeer Montoya, Samantha Villarreal, Mauricio Del Río, Verónica Villarreal, Aurora Luna y Rodrigo Pérez**, sin duda alguna el camino no habría sido tan grato de no ser por ellos, gracias por compartir conmigo sus conocimientos, gracias por su apoyo incondicional y cariño.

A todo el equipo de laboratorio en especial a el **Q.F.B. Andrés Valdés** y la **Q.F.B. Andrea López** que siempre me ofrecieron su apoyo y por la bonita amistad que formamos.

A mis padres **Romelia Hernández y Guillermo Delgado**, gracias por darme la vida, por todo su amor y por su apoyo incondicional, les debo todo, gracias por todo. A mi abuela **Amelia Chávez**, por siempre creer en mí y procurarme. Los amo.

A todos mi **familia y amigos incondicionales**, que siempre se hicieron presente, cada uno de ellos son parte importante en mi vida, gracias por siempre animarme, escucharme y apoyarme, por todo su cariño y por creer en mí.

DEDICATORIA

A mis padres y mi abuela.

ÍNDICE

| Contenido | Página |
|---|--------|
| COMITÉ DE TESIS | i |
| DIRECCIÓN DE TESIS | ii |
| DERECHOS DE AUTOR..... | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| DEDICATORIA | v |
| ÍNDICE | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS | xi |
| RESUMEN | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Generalidades de los estafilococos coagulasa negativos..... | 3 |
| 2.1.1 Taxonomía y clasificación..... | 4 |
| 2.2 Epidemiología..... | 5 |
| 2.3 Importancia clínica..... | 6 |
| 2.4 Detección e identificación..... | 7 |
| 2.5 <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 8 |
| 2.6 <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 9 |
| 2.7 Patogenicidad y factores de virulencia..... | 10 |
| 2.8 Producción de biopelícula..... | 11 |
| 2.9 Composición de biopelícula..... | 13 |
| 2.9.1 Polisacáridos extracelulares..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 2.9.2 eDNA..... | 14 |
| 2.9.3 Proteínas..... | 14 |
| 2.10 Resistencia a antibióticos en células planctónicas..... | 15 |
| 2.11 Resistencia a antibióticos en células de biopelícula..... | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 4. HIPÓTESIS | 20 |
| 5. OBJETIVOS | 21 |
| 5.1 Objetivo general | 21 |
| 5.1.1 Objetivos específicos | 21 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 6.1 Selección de aislamientos..... | 22 |
| 6.1.1 Criterios de inclusión y exclusión..... | 22 |
| 6.2 Reactivación metabólica..... | 22 |
| 6.3 Identificación a nivel especie..... | 22 |
| 6.4 Determinación de la producción de biopelícula..... | 23 |
| 6.5 Determinación de la composición de biopelícula..... | 24 |
| 6.5.1 Composición de la biopelícula..... | 24 |
| 6.6 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos..... | 25 |
| 6.6.1 Preparación de las soluciones stock de los antibióticos..... | 25 |
| 6.6.2 Preparación del panel de antibióticos..... | 26 |
| 6.6.3 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos en células Planctónicas..... | 26 |
| 6.6.4 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos en células de Biopelícula..... | 27 |
| 7. RESULTADOS | 28 |
| 7.1 Identificación..... | 28 |
| 7.2 Nivel de producción de biopelícula..... | 29 |

| | | |
|-----|--|----|
| 7.3 | Composición de biopelícula..... | 29 |
| 7.4 | Susceptibilidad en células planctónicas..... | 30 |
| 7.5 | Susceptibilidad en células de biopelícula..... | 32 |
| 8. | DISCUSIÓN | 33 |
| 9. | CONCLUSIONES | 39 |
| 10. | PERSPECTIVAS | 40 |
| 11. | BIBLIOGRAFÍA | 41 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| 1. Datos demográficos de pacientes con CoNS incluidos en el estudio..... | 28 |
| 2. Susceptibilidad a los antibióticos de CoNS ($n=72$) en células planctónicas..... | 30 |
| 3. Susceptibilidad a los antibióticos de CoNS ($n=28$) en células de biopelícula..... | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figuras | Página |
|--|---------------|
| 1. Nivel de producción de biopelícula | 29 |
| 2. Desprendimiento de biopelícula en estafilococos coagulasa negativos | 30 |
| 3. Porcentaje de aislamientos susceptibles y resistentes a antibióticos en células planctónicas | 31 |

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| CoNS | Estafilococos coagulasa negativos |
| MALDI-TOF MS | Espectrometría de masas por 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 biopelícula |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| PIA | Adhesina intracelular de polisacárido |
| DO | Densidad óptica |
| CLSI | Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio |
| ml | Mililitros |
| μl | Microlitros |
| mg | Miligramos |
| μg | Microgramos |
| nm | Nanometros |
| UV | Luz ultravioleta |

RESUMEN

Los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) son bacterias comensales de la piel, pero también son patógenos importantes en entornos nosocomiales, y representan un gran porcentaje en la morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados, ya que provocan infecciones asociadas a dispositivos, infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la vía central y enfermedades como bacteriemia, endocarditis, entre otras. Diferentes aislamientos de CoNS son los responsables de todas estas enfermedades, entre ellos *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*. Cuentan con diferentes factores de virulencia y patogenicidad, como la formación de biopelículas, y tanto éstas como las células planctónicas son resistentes a diversos antibióticos, lo que representa un gran problema terapéutico. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición de la biopelícula y su papel en la resistencia a los antibióticos entre las especies de CoNS causantes de bacteriemias. Se trabajó con aislamientos clínicos de CoNS recuperados del año 2019, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL y del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. Se realizó la identificación a nivel especie a través de la espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). Se determinó la producción y composición de la biopelícula de aislamientos clínicos de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* mediante la tinción con cristal violeta y ensayos de desprendimiento. Se determinó el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de cada una de las especies, mediante la técnica de microdilución en caldo y Calgary. Se obtuvieron 72 aislamientos clínicos provenientes de hemocultivos, 54 de ellos fueron *S. epidermidis* y 18 *S. haemolyticus*. Del total de los aislamientos 40 (55.6%) fueron productores de biopelícula. La composición de la biopelícula fue heterogénea, sin embargo, las proteínas fueron el principal componente con un promedio del 75%, seguido de los carbohidratos con un 65% y el eDNA con un 55%. Se presentó mayor porcentaje de resistencia a oxacilina y penicilina en las células planctónicas y un 100% de susceptibilidad a vancomicina. En el caso de linezolid se encontró un 15.3% de resistencia. Las células de biopelícula fueron resistentes a los antibióticos hasta 13 veces más que las células planctónicas.

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are commensal bacteria of the skin, but they also are important pathogens, especially in nosocomial environments, since they have high morbidity and mortality in hospitalized patients, as they cause device-associated infections, central line-associated bloodstream infections, bacteremia, among others. Different CoNS isolates are responsible for all these diseases, including *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*. They have different virulence and pathogenicity factors, such as biofilms formation. Biofilm and planktonic cells can be resistant to various antibiotics, which represents a great therapeutic problem. The aim of this study was to determine the composition of biofilm and its role in antibiotic resistance among the species of CoNS causing bacteremia. Clinical isolates of CoNS were recovered from the University Hospital "Dr. José Eleuterio González" of the UANL and the Civil Hospital of Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" during year 2019. Species-level identification was performed through matrix-assisted desorption/ionization mass spectrometry coupled to a flight time analyzer (MALDI-TOF). The production and composition of biofilm from clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* was determined by violet crystal staining and detachment assays. The profile of susceptibility to antibiotics in planktonic and biofilm cells of each species was determined using broth microdilution and Calgary. In total, 72 clinical isolates were obtained from blood cultures, 54 of them were *S. epidermidis* and 18 were *S. haemolyticus*. Of the total isolates, 40 (55.55%) were biofilm producers. The composition of biofilm was heterogeneous; proteins were the main component with an average of 75%, followed by carbohydrates with 65% and eDNA with 55%. High resistance to oxacillin and penicillin in planktonic cells was detected, and 100% of susceptibility to vancomycin. In addition, 15.3% of resistance to linezolid was found. Biofilm cells up to 10 times more resistant to antibiotics compared to planktonic cells.

1. INTRODUCCIÓN

Los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) fueron considerados por mucho tiempo como componentes comensales de la piel humana sana y microbiota de las mucosas. Sin embargo, durante las últimas décadas los CoNS surgieron como patógenos oportunistas causantes comunes de infecciones nosocomiales (Gostev *et al.*, 2021; Heilmann *et al.*, 2019).

Los CoNS representan un grupo heterogéneo dentro del género *Staphylococcus* que no se basa en relaciones filogenéticas. Pueden ser verdaderos no patógenos, hasta facultativos, especies patógenas con potencial de virulencia bajo, medio o incluso alto. Ésta última está restringida a *Staphylococcus lugdunensis*; especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* muestran un potencial patógeno medio, mientras que otras especies como *Staphylococcus carnosus* son completamente apatogénicos (Becker *et al.*, 2014; Heilmann *et al.*, 2019).

Entre las especies que colonizan diferentes nichos de la piel y la mucosa humana, existen algunas que a menudo desarrollan distintos factores de virulencia. Se transmiten principalmente por procedimientos médicos y/o de enfermería. Una vez que son insertados cuerpos extraños, pueden ser colonizados por CoNS y el éxito del procedimiento médico respectivo se ve afectado significativamente, lo que genera enormes cargas médicas y económicas (Argemi *et al.*, 2019). *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* son los colonizadores más frecuentes de la piel humana, causantes de infecciones locales y relacionadas con cuerpos extraños en el torrente sanguíneo (Gostev *et al.*, 2021).

Una propiedad de CoNS crítica es la capacidad de colonizar las superficies de los dispositivos médicos mediante la formación de una matriz estructurada tridimensional compuesta de bacterias y biopolímeros extracelulares, designada como biopelícula. Se puede formar biopelícula en superficies abióticas de dispositivos médicos o en superficies bióticas, como material extraño recubierto con factor huésped o tejido huésped. Las infecciones asociadas a biopelícula son extremadamente difíciles de erradicar porque dentro de la biopelícula, las bacterias están protegidas contra el sistema inmunológico del paciente y la terapia con antibióticos (Michalik *et al.*, 2020).

El aumento de la resistencia a los antibióticos en CoNS, en particular en *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, ha dado lugar a que se limiten las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por estos organismos. Varios estudios han informado que más del 90 % de los CoNS son resistentes a la penicilina, del 64,2 % al 93,6 % de los CoNS son resistentes a la meticilina y todos los CoNS son sensibles a la vancomicina, sin embargo, estudios recientes han notificado CoNS linezolid, se ha identificado una incidencia anual general de 1,2 a 3,2 % de resistencia a linezolid en aislados de sangre de CoNS. En general, las tasas de resistencia han aumentado significativamente, especialmente para oxacilina (Ibrahim & Abu El-Wafa, 2020; Matrat et al., 2020; Ye *et al.*, 2020).

Las infecciones asociadas con la atención de la salud constituyen un grave problema de salud pública en todo el mundo debido a su alta morbilidad y mortalidad, y su manejo ocasiona costos elevados para los pacientes y el sistema de salud. Entre los agentes patógenos que las causan en México se encuentran los grupos de bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos, por lo cual, es muy importante ampliar estos estudios a un mayor número de aislamientos y especies (García *et al.*, 2019).

1. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los estafilococos coagulasa negativos

Staphylococcus spp. son un gran grupo de bacterias presentes en todos los ambientes; sin embargo, estas bacterias solo pueden proliferar en humanos y/o animales. Muchas especies de estafilococos colonizan la piel y las membranas mucosas, representa el grupo bacteriano más grande en la piel sana y las fosas nasales anteriores, también colonizan otros sitios menos frecuentes como el tracto gastrointestinal, la vagina y la axila (Id *et al.*, 2022; Kosecka-Strojek *et al.*, 2018). El género *Staphylococcus* se ha dividido en dos grupos según su capacidad de producir la enzima coagulasa extracelular: estafilococos coagulasa positivos (CoPS) y estafilococos coagulasa negativos (CoNS). El primer grupo está representado por patógenos oportunistas conocidos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus argenteus* entre otros, y el segundo grupo incluye tradicionalmente patógenos, no patógenos u oportunistas; sin embargo, recientemente, varios informes clínicos han presentado CoNS como patógenos peligrosos, particularmente para recién nacidos o pacientes inmunocomprometidos (Diot *et al.*, 2020; Lisowska-Łysiak *et al.*, 2021).

Staphylococcus spp. son cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, son inmóviles, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, negativos para oxidasa, con un contenido de G+C de 30 a 39 %. Crecen en grupos, parejas y ocasionalmente en cadenas cortas. Los estafilococos son catalasa positivos, lo que permite distinguirlos de los estreptococos 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 la morfología macroscópica, se observan 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 CoNS, cada una tiene características específicas que ayuda a diferenciar entre ellas (Becker *et al.*, 2014; García *et al.*, 2019; Madigan MT, Martinko JM, 2015).

Dado que los CoNS son colonizadores comunes de la piel humana, se les ha considerado de forma recurrente como contaminantes de cultivos en lugar de ser reconocidos como el agente causante de infecciones importantes (Natsis & Cohen, 2018). A pesar de su interacción benigna con el hospedador, ahora se sabe que estas especies pueden causar infecciones críticas, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, razón por la cual actualmente son reconocidos como patógenos oportunistas y han ido ganando importancia en el campo de la salud (Heilmann *et al.*, 2019; Widerström *et al.*, 2012).

2.1.1 Taxonomía y clasificación

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*, y *Planococcaceae* pertenecen al orden Bacillales de la clase Bacilli que es parte del *phylum* Firmicutes, el cual comprende bacterias Gram positivas con una baja tasa de G+C contenida en el ADN (Becker *et al.*, 2014).

Entre los estafilococos, *Staphylococcus aureus*, perteneciente al grupo CoPS, y *Staphylococcus epidermidis*, del grupo CoNS, son los más frecuentemente aislados de cada grupo, por lo cual la mayoría de los estudios CoNS se centran en estas especies. Aun así, los CoNS cubren un grupo de bacterias grande y en continuo crecimiento, con más de 50 especies descritas hasta ahora, que actualmente se distribuyen en 41 especies principales, divididas en más de 20 subespecies (Becker *et al.*, 2020). Entre estas especies se incluyen *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lentus*, y *Staphylococcus chromogenes*, y otras especies raras, tales como *Staphylococcus pettenkoferi* (Becker *et al.*, 2014; Kosecka-Strojek *et al.*, 2019; Parte, 2018).

2.2 Epidemiología

Los CoNS representan entre el 12% y el 80% de la mortalidad en pacientes hospitalizados y también se ha asociado una morbilidad del 16% con la bacteriemia por CoNS. En un estudio canadiense de prevalencia puntual de 2017 en hospitales centinela, las infecciones asociadas a dispositivos representaron el 35.6% de todas las infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS) notificadas. De las infecciones asociadas al dispositivo, las infecciones del sitio quirúrgico (ISQ) asociadas con un implante protésico representaron el 19.4% y las infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la vía central (CLABSI, por sus siglas en inglés) representaron el 21.2%. Los CoNS fueron los patógenos notificados con más frecuencia representando un 28.7% (Nosocomiales Programa canadiense de vigilancia de infecciones, 2020). En México hasta el 2016, estos microorganismos habían representado un 8% de las causas de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), sin embargo, el porcentaje ha ido en aumento durante los últimos años (Arias-flores *et al.*, 2016).

Análisis metagenómicos recientes han revelado que los estafilococos prefieren áreas de mayor humedad. Dichos sitios húmedos incluyen las axilas, las regiones glútea e inguinal, el ombligo, los espacios antecubital y poplíteo y la región plantar del pie, la superficie ocular, la conjuntiva suelen estar colonizadas constantemente por CoNS. Un análisis de la composición del cultivo nasal humano reveló que *S. epidermidis* coloniza prácticamente a todos los individuos (97%), seguido de *S. haemolyticus* (44%), *S. hominis* y *S. capitis* (cada uno de ellos 41%), *S. warneri* (32%), y *S. lugdunensis* (26%) (Kaspar *et al.*, 2016). La dinámica de la colonización por CoNS relacionada con la edad puede ocurrir, cepas de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* multifarmacorresistentes están asociados con la colonización y la enfermedad entre los recién nacidos prematuros (Becker *et al.*, 2014). Por otro lado, se considera que CoNS son los microorganismos que predominan en las infecciones articulares periprotésicas (IAP) con un rango en la tasa de detección del 27% al 75%, en estas infecciones asociadas a implantes, la formación de biopelículas es un mecanismo

patológico característico que debilita el efecto de la respuesta inmune fisiológica y también el efecto de una terapia antimicrobiana (Linke *et al.*, 2022).

2.3 Importancia clínica

El aumento del impacto de CoNS en el campo clínico fue enfatizado por el extenso progreso médico, donde el uso de dispositivos médicos implantables y el número creciente de pacientes vulnerables han permitido que causen infecciones significativas en humanos. Más importante aún, estos factores han elevado el número de pacientes mórbidos, enfermos crónicos e inmunodeprimidos, así como las tasas de mortalidad relacionadas con CoNS (Cantey *et al.*, 2018; França *et al.*, 2021).

Aunque los CoNS a menudo mantienen una relación comensal o simbiótica con sus hospedadores, en casos específicos podrían desarrollarse infecciones estafilocócicas, por lo cual, han asumido un gran potencial patógeno, estas especies bacterianas provocan infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos, especialmente las IAAS, las cuales son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, representando un problema creciente en la medicina moderna (Sartelli *et al.*, 2018). Sumado a esto, estos microorganismos se caracterizan por ser resistentes a la meticilina, lo que, a su vez, les resiste a varios antibióticos β -lactámicos y dificulta su erradicación. Por ello, ha sido necesario establecer protocolos específicos de tratamiento con otros antibióticos para las infecciones causadas por este tipo de *Staphylococcus* spp., con la siguiente presión selectiva que favorece la diseminación de dichas cepas (García *et al.*, 2019).

CoNS se centra en enfermedades como bacteriemia, septicemia, neumonías, endocarditis, infecciones del tracto urinario y enfermedades laringológicas. Se define como bacteriemia la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en la extracción de hemocultivos (Iqbal-Mirza *et al.*, 2020; Michalik *et al.*, 2020). Los CoNS pueden causar bacteriemia cuando los dispositivos médicos penetran en la piel y la barrera de las membranas mucosas y entran en la sangre. Con el creciente uso de dispositivos médicos invasivos, como el catéter venoso central (CVC) y la articulación periprotésica, la incidencia de bacteriemia por CoNS asociada a la asistencia sanitaria está aumentando. Los CoNS son la etiología más

frecuente de las bacteriemias asociadas a catéter, dando como manifestaciones clínicas enrojecimiento o hinchazón en la zona percutánea, fiebre, escalofríos, neutropenia grave, trombosis, abscesos, entre otros. La bacteriemia por CoNS aumentan la duración de la hospitalización, la duración de la estancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI), la morbilidad y los costos relacionados con la terapia (Hebeisen *et al.*, 2019).

Dentro de las IAP, los microorganismos más comunes son especies de estafilococos grampositivos, entre ellos, estafilococos coagulasa negativos, como *S. epidermidis*, los pacientes que sufren estas infecciones frecuentemente muestran recurrencias, por lo tanto, la hospitalización prolongada y la recuperación funcional retrasada son consecuencias comunes y posibles razones de la elevada tasa de mortalidad a los cinco años de hasta el 26 % (Arciola *et al.*, 2018; Linke *et al.*, 2022).

La mayoría de las infecciones causadas por CoNS se caracterizan por cursos de infección subagudos y crónicos con síntomas clínicos sutiles. Sin embargo, se han informado cursos más agresivos y resultados letales repentinos en el caso de pacientes tratados de manera inadecuada con infecciones crónicas relacionadas con cuerpos extraños (FBRI). Los FBRI del torrente sanguíneo por CoNS se asocian con estadías en el hospital y en la UCI significativamente más largas, tasas de mortalidad más altas y costos hospitalarios más altos. El diagnóstico tardío de las infecciones por CoNS contribuye a una mayor mortalidad (Frickmann *et al.*, 2018; Heilmann *et al.*, 2019).

2.4 Detección e identificación

El aislamiento y cultivo de CoNS son relativamente fáciles y directos, al igual que la identificación de especies de CoNS que se encuentran con frecuencia. Desde un punto de vista diagnóstico y clínico, es un requisito esencial hacer una distinción clara y válida entre especies de CoNS y especies de CoPS, siendo esta última predominantemente *S. aureus* en muestras clínicas humanas (Becker *et al.*, 2014).

El enfoque estándar para la detección e identificación incluye el cultivo en una placa de agar sangre no selectiva, así como en caldo de enriquecimiento, seguido de

procedimientos bioquímicos y otros relacionados, incluido el uso de sistemas comerciales con fines de identificación (Kosecka-Strojek *et al.*, 2019).

Independientemente de la especie, las placas de cultivo principales utilizadas para el aislamiento de estafilococos a partir de muestras clínicas son los agares Columbia o sangre de soya tripticaseína que contienen un 5% de sangre desfibrinada de carnero (o caballo). La tasa de recuperación puede aumentarse mediante el uso simultáneo de un caldo de enriquecimiento (e.g. caldo dextrosa), con formación de rayas en agar sangre después de 24 y 48 h de crecimiento. Por lo general, el crecimiento de la mayoría de las especies de CoNS ocurre dentro de las 18 a 24 h (Becker *et al.*, 2020).

Una identificación rápida y precisa de los microorganismos es necesaria para el manejo de enfermedades infecciosas, particularmente para elegir una terapia eficaz. Por esta razón, la identificación rutinaria de bacterias y hongos mediante espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una verdadera revolución en los laboratorios de microbiología clínica. Este método es una opción en estudio para su aplicación en la discriminación rápida y directa de cepas formadoras de biopelículas, lo que se mejoraría mediante la introducción de perfiles de proteínas conocidos de cepas productoras y no productoras de biopelículas en la base de datos. La identificación directa, tras el aislamiento, de una cepa bacteriana como productora de biopelículas permitiría desarrollar un plan terapéutico válido y eficaz (Caputo *et al.*, 2018; Lo *et al.*, 2015).

2.5 Staphylococcus epidermidis

La colonización de *S. epidermidis* en humanos comienza inmediatamente después del nacimiento. A pesar de las amplias variaciones interpersonales, los diferentes sitios corporales y edad dentro del mismo hospedador, *S. epidermidis* sigue siendo la especie de microbioma cutáneo aislada con mayor frecuencia. Datos recientes indican que *S. epidermidis* puede pertenecer a los abundantes géneros bacterianos en los microbiomas de las vías respiratorias y del intestino, especialmente en los recién nacidos prematuros y a término hospitalizados (Brown & Alexander, 2020; Dong *et al.*, 2018).

Los estudios descritos hasta la fecha han demostrado que los aislamientos de *S. epidermidis* difieren en cuanto a la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos, la capacidad de formación de biopelículas, el metabolismo y la presencia de secuencias de elementos de inserción (Michalik *et al.*, 2020). Esta especie ha sido ampliamente estudiada a nivel molecular y ha proporcionado la mayor cantidad de datos sobre la presencia de factores de virulencia que podrían identificarse como factores de patogenicidad. La formación de biopelículas es la ruta principal por la cual *S. epidermidis* coloniza e infecta dispositivos protésicos y médicos (Argemi *et al.*, 2019).

2.6 *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus es una bacteria comensal, pero también es un patógeno nosocomial frecuente que se ha descrito principalmente en la bacteriemia relacionada con el catéter, con uno de los grados más altos de resistencia a la meticilina entre los CoNS. *S. haemolyticus* está cada vez más implicado en infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, por lo que es de los principales patógenos entre los pacientes ingresados en UCI, es la segunda causa más común de bacteriemia por CoNS y el segundo más frecuentemente aislado de muestras clínicas infectadas, en particular hemocultivos de pacientes con sepsis después de *S. epidermidis*, representa aproximadamente del 22 al 24% de las infecciones del sistema nervioso central (Argemi *et al.*, 2019; Eltwisy *et al.*, 2020).

Esta especie también es una especie productora de biopelículas, pero curiosamente, análisis de secuenciación genómica completa indicaron que no se encontró el operón *ica*, sino un homólogo del sistema de regulación *agr*, lo que sugiere que mecanismos alternativos estaban implicados en la formación de biopelículas. Por lo tanto, *S. haemolyticus* es un patógeno importante en los seres humanos, pero faltan más estudios de sus factores de virulencia (Hong *et al.*, 2016).

Ambos organismos, como la mayoría de los aislados de CoNS, pueden causar varias infecciones como sepsis, bacteriemia, endocarditis de válvulas nativas y protésicas, infecciones de prótesis articulares, infecciones de tejidos blandos o de la piel y meningitis (Azimi *et al.*, 2020).

2.7 Patogenicidad y factores de virulencia

La virulencia bacteriana es un concepto complejo que debe considerarse desde las perspectivas clínica, molecular y genómica. Clínicamente, la virulencia de un patógeno, de una especie específica o incluso de una cepa clonal, puede referirse a su capacidad inherente para provocar manifestaciones clínicas específicas que pueden estar vinculadas a la producción de un factor de virulencia, a menudo una proteína. Algunos otros factores, como los producidos por bacterias comensales humanas, no actúan como factores de virulencia en condiciones normales, pero estos factores participarán en la patogenicidad bacteriana en condiciones específicas, como durante la ruptura de la barrera cutánea. Los estafilococos son ejemplos de estas caracterizaciones duales de factores de virulencia (Argemi *et al.*, 2019).

Los CoNS poseen un gran número de estrategias diversas para causar infección y sobrevivir en el huésped. En comparación con *S. aureus*, este grupo de bacterias exhibe un potencial patógeno menor, pero existe poca información sobre los mecanismos de virulencia de CoNS. Recientemente los estudios se han centrado en la capacidad de CoNS para producir una variedad de enzimas extracelulares, como proteasas, elastasas, esterases, lipasas y fosfolipasas, así como en la producción de toxinas, como familias de hemolisinas, enterotoxinas, toxinas exfoliativas e incluso TSST-1 (toxina-1 del síndrome de choque tóxico) (Becker *et al.*, 2014; Bukowski *et al.*, 2018; Lepidi, 2018; Stach *et al.*, 2018).

Las enzimas y toxinas juegan un papel crucial en algunos de los efectos de los estafilococos en los organismos hospedadores, incluidos los factores de virulencia en la destrucción de tejidos o bien, como factores de propagación que facilitan la invasión a los tejidos cercanos. En general, las especies de CoNS poseen la capacidad de adherirse, invadir y persistir. Además, una propiedad de CoNS crítica es la capacidad de colonizar las superficies de los dispositivos médicos mediante la formación de una matriz estructurada tridimensional compuesta de bacterias y biopolímeros extracelulares, denominada biopelícula. Se ha reportado que se puede formar biopelícula en superficies abióticas de dispositivos médicos o en superficies bióticas, como material extraño recubierto con factor huésped o tejido huésped. Las infecciones

asociadas a biopelícula son extremadamente difíciles de erradicar porque dentro de la biopelícula, las bacterias están protegidas contra el sistema inmunológico del paciente y la terapia con antibióticos (Arciola *et al.*, 2018; Michalik *et al.*, 2020).

La identificación de los factores que aumentan la patogenicidad de CoNS es una gran necesidad, especialmente para los médicos y microbiólogos. Es muy importante ampliar estos estudios a un mayor número de aislamientos y especies, pero hay pruebas sólidas de que la transferencia horizontal de genes es responsable de la transmisión del factor de virulencia entre especies (Heilmann *et al.*, 2019).

2.8 Producción de biopelícula

Un factor crítico de patogenicidad de CoNS es su capacidad para colonizar las superficies de los dispositivos médicos mediante la formación de una matriz estructurada tridimensional compuesta por bacterias y biopolímeros extracelulares. Georg Peters (1951-2018) llamó a esta matriz 'limo' en su trabajo pionero a principios de la década de 1980 que visualizaba estafilococos en catéteres intravenosos infectados naturalmente. Ahora comúnmente se lo conoce como 'biopelícula' (Heilmann *et al.*, 2019).

La producción de biopelículas es una estrategia exitosa para garantizar la supervivencia microbiana y establecer la infección. Dado que los mecanismos de defensa del huésped y la respuesta a los agentes antimicrobianos se ven comprometidos por la presencia de biopelículas bacterianas, las infecciones crónicas relacionadas con el biofilm y la sepsis son motivo de gran preocupación (Pinheiro *et al.*, 2015).

Pueden formarse biopelículas en superficies abióticas de dispositivos médicos o en superficies bióticas, como material extraño recubierto de factor huésped o tejido huésped. Dentro de la biopelícula, las bacterias están protegidas contra el sistema inmunológico del paciente y la terapia con antibióticos, lo que explica por qué las infecciones asociadas a la biopelícula son extremadamente difíciles de erradicar. En

la formación de biopelículas, se pueden distinguir cuatro pasos, que se muestran en la Figura 1 (Heilmann *et al.*, 2019; Paharik *et al.*, 2016).

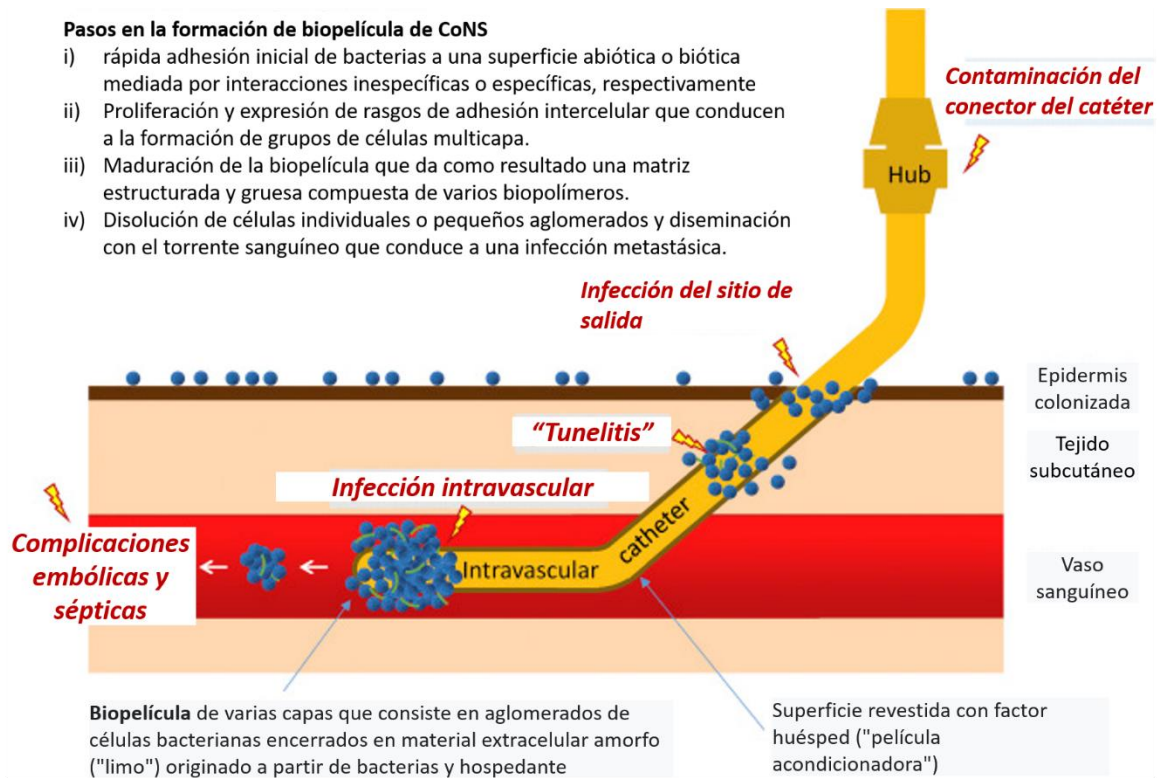


Figura 1. Patología de la formación de biopelículas y entidades clínicas asociadas con la infección del torrente sanguíneo relacionada con el catéter (Heilmann *et al.*, 2019).

La formación de biopelículas bacterianas consta de varios pasos. Inicialmente, la unión superficial de las bacterias planctónicas se refuerza con ayuda de proteínas o apéndices adhesivos de la superficie. Tras la unión irreversible y la formación de microcolonias, las bacterias inducen factores para la producción y secreción de componentes de la matriz extracelular, lo que da como resultado la formación de una arquitectura de biopelícula tridimensional. Finalmente, una biopelícula madura requiere dispersión para evitar el crecimiento excesivo dañino, la limitación de nutrientes y la acumulación de productos metabólicos de desecho, por lo que, algunas bacterias se desprenderán del biofilm maduro para retomar una vida planctónica (Otto, 2018; Schulze *et al.*, 2021).

La dispersión puede ser un mecanismo activo o mediado pasivamente por factores de estrés físicos como las fuerzas de cizallamiento. El desapego activo se basa en la

expresión diferencial de genes desencadenada por diversas señales ambientales, como cambios de temperatura y pH, óxido nítrico, inanición, privación de oxígeno y otros factores estresantes (McDougald *et al.*, 2012).

2.9 Composición de biopelícula

La composición de la biopelícula consiste en un conglomerado de diferentes sustancias que juntas brindan integridad estructural, puede estar compuesta por agua, polisacáridos, proteínas, lípidos, tensioactivos, glicolípidos, ADN extracelular (eDNA), ARN extracelular, ácidos teicoicos, vesículas de membrana, iones como Ca^{2+} . En muchas bacterias, los polisacáridos extracelulares y el eDNA son componentes destacados de la biopelícula (Uru *et al.*, 2021).

1.9.1 Polisacáridos extracelulares: En muchas bacterias, el desarrollo de una biopelícula madura se asocia con la producción de exopolisacáridos, que la mayoría de las veces, suelen ser el componente principal de la matriz de la biopelícula. La principal clase de exopolisacáridos del biofilm en los estafilococos es la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA) o, según su composición química, un polímero de N-acetilglucosaminas unidas a $\beta 1 \rightarrow 6$ (PNAG), respectivamente. La PIA, es la más importante de los estafilococos y es esencial para la formación de biopelículas y virulencia en *S. epidermidis*, la cual es sintetizada por las proteínas expresadas a partir del operón *icaADBC* (adhesión intercelular). La N-acetilglucosamina transferasa IcaA, junto con IcaD, sintetiza un oligómero de N-acetilglucosamina. El crecimiento de la cadena depende del IcaC, que se sugiere actuar como exportador de PIA. PIA es parcialmente desacetilado en la superficie bacteriana por la PIA desacetilasa IcaB. Este paso es crucial para la retención de PIA y, por lo tanto, para las diversas funciones que cumple PIA, no solo la formación de biopelículas, sino también la resistencia a los péptidos antimicrobianos y la fagocitosis de neutrófilos, la pérdida parcial de los grupos N-acetilo después de la secreción da como resultado un carácter catiónico que facilita las interacciones electrostáticas

con otras moléculas extracelulares y las propiedades adhesivas de la matriz del biofilm (Schulze *et al.*, 2021).

1.9.2 eDNA: Cada vez es más evidente que el eDNA es un componente de la matriz polimérica de biopelículas bacterianas y es muy probable que se origine a partir de la lisis celular (Sarkar, 2020). Es importante destacar que varias bacterias secretan nucleasas para degradar el eDNA, lo que lo convierte en un componente estructural bastante flexible y permite que las bacterias se adapten a los cambios ambientales a través de la modulación del eDNA, el cual, a menudo está involucrado en la adhesión, particularmente después de la primera interacción de la célula con el sustrato (Schulze *et al.*, 2021).

Interviene en las interacciones ácido-base y aumenta la hidrofobicidad de las células bacterianas, lo que favorece la interacción célula-sustrato. De hecho, el eDNA se usa para iniciar la formación de biopelículas en muchas bacterias patógenas, incluidas las bacterias Gram positivas, facilita la interacción de las bacterias en la matriz extracelular. Esto se logra mediante la unión de segmentos cargados positivamente de proteínas expuestas en la superficie celular con las moléculas de eDNA cargadas negativamente. Varias proteínas pueden estar implicadas en esta interacción, como las proteínas asociadas a la pared celular en bacterias Gram positivas. Por lo tanto, el anclaje del eDNA a la superficie celular mediante proteínas de unión al ADN es un mecanismo generalizado para la formación de biopelículas, por otro lado, también puede mediar en las interacciones con otros componentes de la matriz extracelular, como los polisacáridos. Juntas, estas interacciones son relevantes para la integridad estructural de las biopelículas (Uru *et al.*, 2021).

1.9.3 Proteínas: Otro componente importante de la matriz de la biopelícula bacteriana son las proteínas. La mayoría de las proteínas estudiadas contribuyen a las propiedades adhesivas, la estabilidad y la morfología de la biopelícula, debe tenerse en cuenta que algunas proteínas asociadas con las biopelículas exhiben propiedades enzimáticas, por ejemplo, hidrolasas

de azúcar, proteasas y las nucleasas mencionadas anteriormente, que degradan y modulan activamente otros componentes de la matriz, lo que resulta en la reorganización y dispersión de la biopelícula. Los miembros de la familia de proteínas Bap son proteínas grandes que se encuentran en la matriz del biofilm de varias bacterias Gram negativas y positivas, incluidas *S. aureus* y *S. epidermidis* (Schulze *et al.*, 2021). Muchas de las proteínas están involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, el desprendimiento de células de la biopelícula o la degradación de polímeros para la adquisición de nutrientes (Uru *et al.*, 2021).

2.10 Resistencia a antibióticos en células planctónicas

La importancia de las especies de CoNS ha aumentado a lo largo de los años, principalmente debido a su perfil de resistencia a múltiples fármacos y su capacidad para crecer como biopelícula, que son incluso más refractarias a los antibióticos. Se han discutido varios mecanismos relacionados con el aumento de la resistencia a los antimicrobianos, a partir de los cuales (i) la barrera formada por la matriz que rodea a las células dentro de la biopelícula, cuyo grosor y composición puede dificultar la penetración y/o difusión de los antibióticos, y (ii) se destaca el hecho de que la biopelícula de los estafilococos es muy propensa a mutaciones que pueden incrementar su resistencia a los antibióticos. Otra posible explicación de la alta tasa de resistencia a los antimicrobianos es que los CoNS comparten los mismos nichos de colonización con *S. aureus*, lo que permite la transferencia horizontal de genes (HGT) de varios genes y elementos móviles que codifican la resistencia a los antibióticos. De hecho, la HGT entre especies de estafilococos ya ha sido probada con la detección de muchos fenotipos resistentes relacionados con genes multifarmacoresistentes localizados en elementos genéticos móviles (França *et al.*, 2021).

Se sabe que algunas de las especies más representativas de CoNS presentan una alta tasa de resistencia a la meticilina como, por ejemplo, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. sciuri*. Estudios de Europa a América del Norte han demostrado que del 60 al 80% de las especies de CoNS recuperadas de infecciones del torrente sanguíneo eran MR-CoNS. A lo largo de los años, ha habido un aumento en el número de cepas de CoNS resistentes

a los glicopéptidos, que son los antibióticos que se utilizan a menudo para tratar las infecciones por MR-CoNS, así como la aparición de resistencia a los antibióticos más nuevos, lo que dificulta las opciones de tratamiento actuales. Por ejemplo, se demostró que *S. epidermidis* es resistente a hasta ocho antibióticos distintos con diferentes mecanismos de acción y se estima que, entre las cepas aisladas nosocomiales, el 80% de los aislamientos presentan resistencia a antibióticos más allá de la meticilina (Becker *et al.*, 2020).

En contraste con estudios previos con una amplia gama de CoNS, donde pocos aislamientos y especies presentaron mayor tolerancia a antibióticos como vancomicina y teicoplanina, se ha informado la aparición de aislamientos con susceptibilidad reducida a los glicopéptidos en varias especies. Afortunadamente, la vancomicina sigue siendo un antibiótico eficaz contra la mayoría de los aislamientos de CoNS, y se encuentra en la lista de los principales antibióticos utilizados para combatir estas infecciones, ya sea solo o en combinación con otros antibióticos como cefazolina, rifampicina y fosfomicina, entre otros (Williams *et al.*, 2020).

La rifampicina también se usa con frecuencia para tratar infecciones estafilocócicas; sin embargo, este antibiótico se asocia con el rápido desarrollo de resistencia cuando se usa solo y, como tal, debe usarse como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso de vancomicina o levofloxacina con rifampicina es una buena combinación para tratar estas infecciones. En los últimos años se han encontrado aumentos significativos y preocupantes de la resistencia a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina y tetraciclina (Becker *et al.*, 2014).

La resistencia a la tetraciclina se basa comúnmente en la adquisición de genes de resistencia móviles que conducen a la disociación de las tetraciclinas de sus sitios de unión ribosómica y al transporte de los agentes antimicrobianos fuera de la célula a través de bombas de salida de fármacos (Becker *et al.*, 2020).

Linezolid pertenece a una clase más nueva de antibióticos (oxazolidinonas) y apareció como una alternativa prometedora para combatir las infecciones estafilocócicas con resistencia a múltiples fármacos a los antibióticos comunes, incluidos los

glicopéptidos, a los que las bacterias ya han desarrollado mecanismos de resistencia. No obstante, ya se ha informado de resistencia a linezolid en estafilococos, incluido CoNS (Michalik *et al.*, 2020).

Otro antimicrobiano perteneciente a los antibióticos de próxima generación es la daptomicina, que ha demostrado ser más eficaz que la vancomicina contra MR-CoNS. A pesar de ser un antibiótico nuevo, ya existen informes de cepas resistentes a la daptomicina, por lo que puede sugerirse la terapia de combinación con otros antibióticos como la rifampicina (França *et al.*, 2021).

2.11 Resistencia a antibióticos en células de biopelícula

La biopelícula proporciona a las células protección contra el sistema inmunológico del huésped, así como contra los tratamientos antimicrobianos, lo que fomenta la adquisición de resistencia y el desarrollo de bacterias multifarmacorresistentes. Se sugieren varios mecanismos de resistencia a los antibióticos de las cepas formadoras de biopelículas. La primera hipótesis es la penetración lenta o incompleta del antibiótico dentro de la estructura de la biopelícula. La segunda hipótesis condiciona la actividad antibiótica a la diferenciación química del microambiente de la biopelícula. Según la tercera hipótesis, se forma una subpoblación de microorganismos muy protegidos similares a las esporas en las estructuras de la biopelícula. Esta hipótesis se confirma en un estudio sobre estructuras de biopelículas recién formadas, que aún son demasiado delgadas para presentar una barrera mecánica contra la penetración de antibióticos (Schulze *et al.*, 2021).

El tratamiento y control actual de la biopelícula es complicado, porque se han desarrollado antimicrobianos contra bacterias y microorganismos cultivados en forma planctónica en etapa metabólicamente activa. Los antibióticos convencionales se pueden usar para tratar las biopelículas hasta cierto punto, sin embargo, son menos efectivos, la terapia debe evaluarse caso por caso, ya que la eficacia varía según la especie bacteriana, la ubicación de la infección y el modo de administración. De lo contrario, el uso ineficaz de antibióticos aumenta el riesgo de resistencia a los antibióticos (Høiby *et al.*, 2015; Schulze *et al.*, 2021; Wojtyczka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la composición de la biopelícula y su papel en la resistencia a los antibióticos entre las especies de CoNS causantes de bacteriemias asociadas a catéter.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estafilococos coagulasa negativos son patógenos importantes de infecciones nosocomiales. Entre las principales especies causantes de bacteriemias se encuentran *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*. La capacidad de formación de biopelículas facilita su colonización e infección en dispositivos protésicos.

En México hay escasos estudios respecto a los factores de virulencia, composición de la biopelícula y su papel en la resistencia a los antibióticos entre las especies de CoNS obtenidos de hemocultivos.

4. HIPÓTESIS

La composición de la biopelícula tiene un papel importante en la resistencia a los antibióticos en CoNS, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, obtenidos de hemocultivos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la composición de la biopelícula y su papel en la resistencia a los antibióticos entre las especies de CoNS obtenidos de hemocultivos.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar a nivel especie los aislamientos clínicos de CoNS obtenidos de hemocultivos.
2. Determinar la producción y composición de la biopelícula de aislamientos clínicos de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*.
3. Determinar el perfil de susceptibilidad a distintos antibióticos en células planctónicas de cada una de las especies.
4. Determinar el perfil de susceptibilidad a distintos antibióticos en células de biopelícula de cada una de las especies.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Selección de aislamientos

Se incluyeron aislamientos clínicos de CoNS recuperados del año 2019, los cuales se encontraban conservados en tubos crioviales con caldo *Brucella* con 15% de glicerol a -80 °C. Los aislamientos incluidos fueron obtenidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” de la Universidad de Guadalajara.

6.1.1 Criterios de inclusión y exclusión

Se tomaron en cuenta todos aquellos aislamientos clasificados como CoNS y se descartaron aquellos aislamientos que no fueron identificados como *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Se seleccionaron 72 aislamientos provenientes de sangre, de acuerdo con los criterios propuestos por la norma oficial mexicana: NOM-045-SSA2-2005. Se descartaron todos aquellos especímenes que pudieran tratarse de una contaminación como en el caso de heridas, biopsias superficiales, etc.

6.2 Reactivación metabólica

Los aislamientos se sembraron en agar sangre y se incubaron a 37°C durante 24 h, posteriormente 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.

6.3 Identificación a nivel especie

Se realizó la identificación a nivel especie a través de la espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). 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, después cada aislamiento se colocó en cada uno de los pocillos. Posteriormente se añadió 1 µl de ácido fórmico al 70% (v/v) a cada pocillo para facilitar la extracción proteica y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Seguido de esto, se adicionó 1 µl 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 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania), 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. Se tomó como una identificación confiable de género y especie un score ≥ 2.0 , el score entre 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.

6.4 Determinación de la producción de biopelícula

Se determinó de forma semicuantitativa mediante la tinción con cristal violeta (Christensen et al. 1985). Se transfirió una colonia de cultivo puro de 24 h en agar sangre a caldo de soya tripticaseína, se incubó a 37°C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se realizó una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticaseína suplementado con 1% de glucosa. De esta dilución se transfirieron 200 μ l y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Corning® Costar®, NY, USA). Se hicieron 4 repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control con medio sin inocular. Para determinar la densidad óptica (DO) 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 de la biopelícula adicionando 200 μ l de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, posteriormente se desechó el metanol y se retiró el exceso de líquido. Seguido se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril quitando el exceso de agua. Después se le añadieron 200 μ l de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos y se dejaron incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez que transcurrió el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadieron a cada pocillo 200 μ l de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se permitió actuar durante 15 min a temperatura ambiente con la finalidad de disolver la biopelícula. 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 considera no productor, en el rango 0.120 a 0.240 como productor débil y DO >0.240 como productor fuerte (Christensen *et al.*, 1985).

6.5 Determinación de la composición de biopelícula

Se realizaron ensayos de desprendimiento de la biopelícula a los aislamientos productores, utilizando distintos sustratos que degradan específicamente cada uno los componentes de la matriz extracelular (carbohidratos, proteínas y ADN).

6.5.1 Composición de la biopelícula

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se transfirió una colonia a caldo soya tripticasa y se incubó a 37 °C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se hizo una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticaseína 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 contuvieron 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 de la biopelícula 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, se retiró el exceso de agua y se dejaron secar por completo a temperatura ambiente. Una vez secas se le añadieron 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 I (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 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 37 °C durante 24 h. La placa con la adición de NaIO₄ se cubrieron 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, retirando el exceso de agua. Después se le añadieron 200 µl de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos de las cuatro placas y se dejaron incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadieron a cada pocillo 200 µl de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se dejaron actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la densidad óptica en un lector de microplacas (iMark™, BioRad 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 la biopelícula (Mendoza et al., 2015).

6.6 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

Se realizó 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, 2020). Se seleccionaron los antibióticos correspondientes a los siguientes grupos de antibióticos: penicilinas (oxacilina y penicilina), glicopéptidos (vancomicina), fluoroquinolonas (levofloxacino), inhibidores de folato (trimetroprim), ansamicinas (rifampicina), oxazolidinonas (linezolid) y lipopéptidos (daptomicina). La metodología empleada para la susceptibilidad en células de biopelícula 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 400 µg/ml de todos los antibióticos. Se pesaron 0.006 g de la presentación en polvo de cada antibiótico (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y se diluyeron en 15 ml del diluyente correspondiente a cada uno

descrito en el manual de procedimientos del CLSI en el documento M-100, 2020. 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 biopelícula. 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 diluyeron en caldo Müeller-Hinton con cationes ajustados de NaCl 2% (p/v) y para daptomicina se diluyeron en caldo Müeller-Hinton con cationes ajustados de Ca²⁺ 50 mg/ml. 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 ocho pocillos como control negativo y ocho como control positivo. Los paneles de antibióticos se guardaron en congelación a -80 °C hasta su uso.

6.6.3 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos en 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 625 nm). A partir del inóculo, éste se diluyó a razón 1:150 en caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. Después se tomaron 100 µl y se transfirieron a cada pocillo del panel de antibióticos dejando ocho pocillos sin inocular como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °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 (CLSI, 2022).

6.6.4 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos en células de biopelícula

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 625 nm). A partir del inóculo, este se diluyó a razón 1:50 en caldo soya tripticasa adicionado con 1% (p/v) de glucosa. Después, se tomaron 150 μ l 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 Calgary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá) quedando las clavijas inmersas en el medio. Se incubaron a 37 °C por 24 h sobre un agitador a 150 rpm. 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 37°C por 18-24 h. Posteriormente se retiró la tapa del panel de antibióticos y se enjuagaron las clavijas dos veces con PBS pH 7.3 y se transfirió la tapa a una microplaca estéril conteniendo 200 μ l en cada pocillo caldo Müeller-Hinton, la cual se sonicó 10 min en un ultrasonicador (Branson 5800, Danbury, USA), después se retiró la tapa con las clavijas y se cambió a una tapa normal. Las placas se incubaron a 37°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.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación

En total se incluyeron 72 aislamientos provenientes de hemocultivos, identificados previamente como CoNS. La identificación a nivel especie fue confirmada mediante MALDI-TOF MS. De esos 72 aislamientos, 71 (98.62%) eran de Jalisco, 1 (1.38%) de Nuevo León. La mayor parte de los aislamientos correspondieron a muestras de pacientes de género masculino ($n=32$, 44.44%). *S. epidermidis* fue la especie más frecuente con un 75.00% (54/72). Del total de los aislamientos, 51.38% ($n=37$) fueron procedentes de la unidad de cuidados intensivos. Ambas especies fueron más frecuentes en el rango de edad de 0-20 años. Los datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos de pacientes con CoNS incluidos en el estudio.

| Características | Total | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
|-------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | n (%) | n (%) |
| No. de pacientes | 72 (100.00) | 54 (100.00) | 18 (100.00) |
| Procedencia | | | |
| Jalisco | 71 (98.62) | 53 (88.00) | 18 (100.00) |
| Nuevo León | 1 (1.38) | 1 (2.00) | 0 (0.00) |
| Rango de edad | | | |
| 0-20 | 58 (80.55) | 44 (81.48) | 14 (77.80) |
| 20-40 | 8 (11.11) | 4 (7.40) | 4 (22.20) |
| 40-60 | 4 (5.55) | 4 (7.40) | 0 (0.00) |
| 60-80 | 2 (2.77) | 2 (3.70) | 0 (0.00) |
| Sala hospitalaria | | | |
| Unidad de Cuidados Intensivos | 37 (51.38) | 28 (52.00) | 9 (50.00) |
| Medicina general | 12 (16.66) | 10 (18.00) | 2 (11.00) |
| Urgencias | 9 (12.5) | 6 (11.00) | 3 (17.00) |
| Otros | 14 (19.44) | 10 (19.00) | 4 (22.00) |

7.2 Nivel de producción de biopelícula

Del total de los aislamientos, 40 (55.55%) fueron productores de biopelícula. Para *S. epidermidis*, el 53.7% ($n=29$) fueron fuertes y el 18.5% ($n=10$) débiles productores de biopelícula. Por otro lado, en el caso de *S. haemolyticus*, solamente el 5.6% ($n=1$) fue productor débil de biopelícula, por lo que el resto fue no productor (Figura 1).

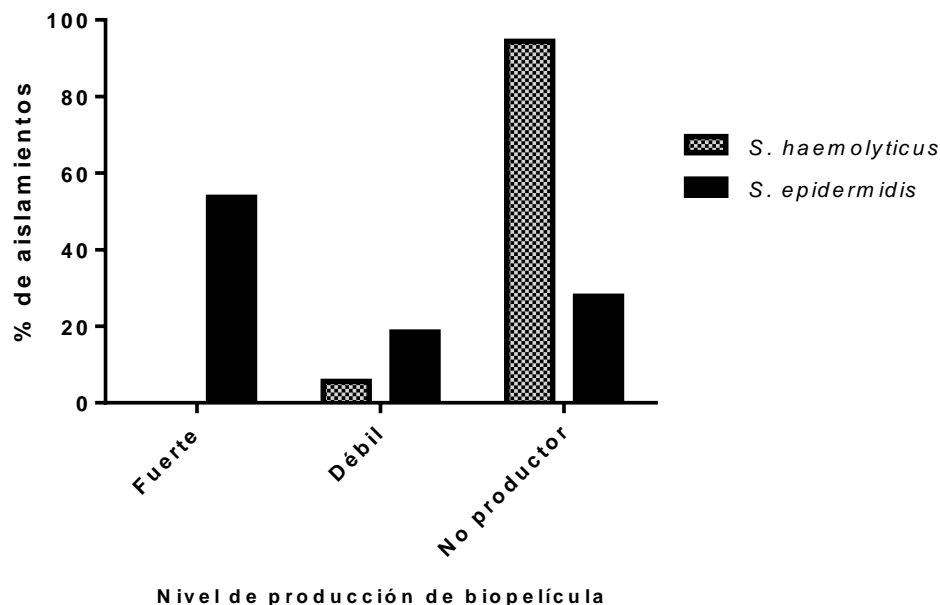


Figura 1. Nivel de producción de biopelícula. Porcentaje de aislamientos de *S. haemolyticus* ($n=1$) y *S. epidermidis* ($n=39$) con distinto nivel de producción de biopelícula.

7.3 Composición de biopelícula

Los criterios de evaluación se llevaron a cabo de la siguiente manera: <10% sin desprendimiento, 10 a 50% desprendimiento intermedio, 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y >75% desprendimiento fuerte. Los mayores porcentajes de desprendimiento se interpretaron como la composición más abundante de biopelícula. En la Figura 2 se describen los resultados de acuerdo a este criterio. La composición de biopelícula fue heterogénea entre las cepas. El principal componente de la biopelícula fueron las proteínas con un desprendimiento fuerte de un 70-95%, seguido de los carbohidratos con un 60-80% y DNA extracelular con un 50-60%.

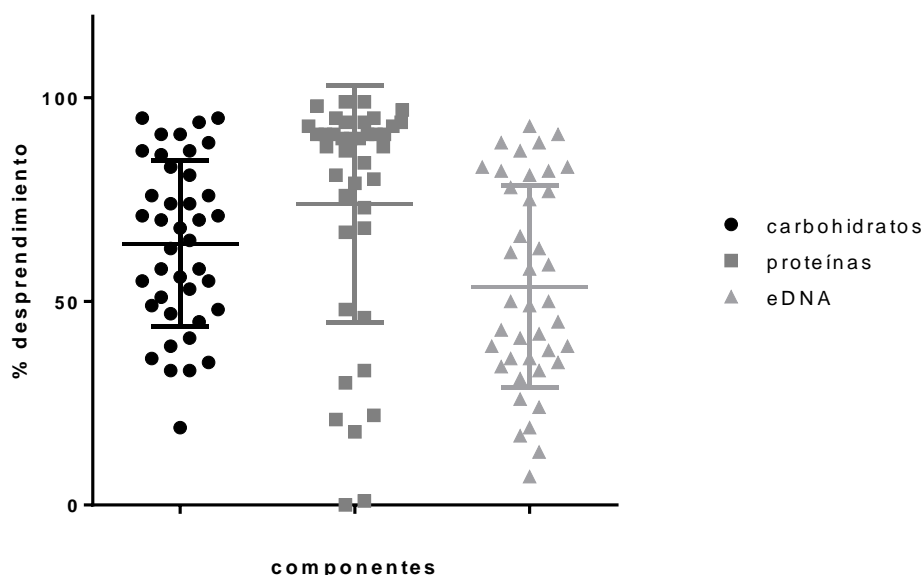


Figura 2. Desprendimiento de biopelícula en estafilococos coagulasa negativos. Porcentaje de desprendimiento de biopelícula de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* ($n=40$).

7.4 Susceptibilidad en células planctónicas

En el perfil de susceptibilidad en células planctónicas, los aislamientos presentaron alta susceptibilidad a vancomicina (100.0%), daptomicina (93.0%), rifampicina (73.6%). Por otro lado, el mayor porcentaje de resistencia se encontró a penicilina (90.3%), oxacilina (72.3%), trimetoprim (73.7%) y levofloxacino (69.5%). Se detectó 15.3% de resistencia a linezolid. Los resultados de la CMI₅₀ y la CMI₉₀ así como los porcentajes de resistencia y susceptibilidad se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 3.

Tabla 2. Susceptibilidad a los antibióticos de CoNS ($n=72$) en células planctónicas.

| Grupo de antibiótico | Antibiótico | Rango ($\mu\text{g/ml}$) | CMI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) | CMI ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$) | S % (n) | I % (n) | R % (n) |
|-----------------------|---------------|----------------------------|--|--|-------------|-------------|-------------|
| Penicilinas | Oxacilina | 0.125 - >32 | 8 | <0.06 | 27.7 (20) | NA | 72.3 (52) |
| Penicilinas | Penicilina | 0.25 - >32 | 2 | <0.06 | 9.7 (7) | NA | 90.3 (65) |
| Glucopéptidos | Vancomicina | 0.5 - 2 | 1 | <0.06 | 100 (72) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |
| Fluoroquinolonas | Levofloxacino | 0.06 - >16 | 64 | <0.06 | 30.5 (22) | 0.0 (0) | 69.5 (50) |
| Inhibidores de folato | Trimetoprim | <0.125 - >64 | >64 | <0.06 | 26.3 (19) | NA | 73.7 (53) |

| | | | | | | | |
|----------------|-------------|-------------|-------|-------|--------------|------------|--------------|
| Ansamicinas | Rifampicina | 0-06 - >32 | <0.06 | <0.06 | 70.8 (51) | 2.7 (2) | 26.4 (19) |
| Oxazolidinonas | Linezolid | 0.5 - >64 | 2 | 1 | 84.7 (61) | NA | 15.3 (11) |
| Lipopéptidos | Daptomicina | 0.125 - >32 | 0.5 | 0.25 | 93.0 (67) | NA | 7.0 (5) |

CMI: concentración mínima inhibitoria; S: susceptible; I: intermedio; R: resistente; NA: No Aplica.

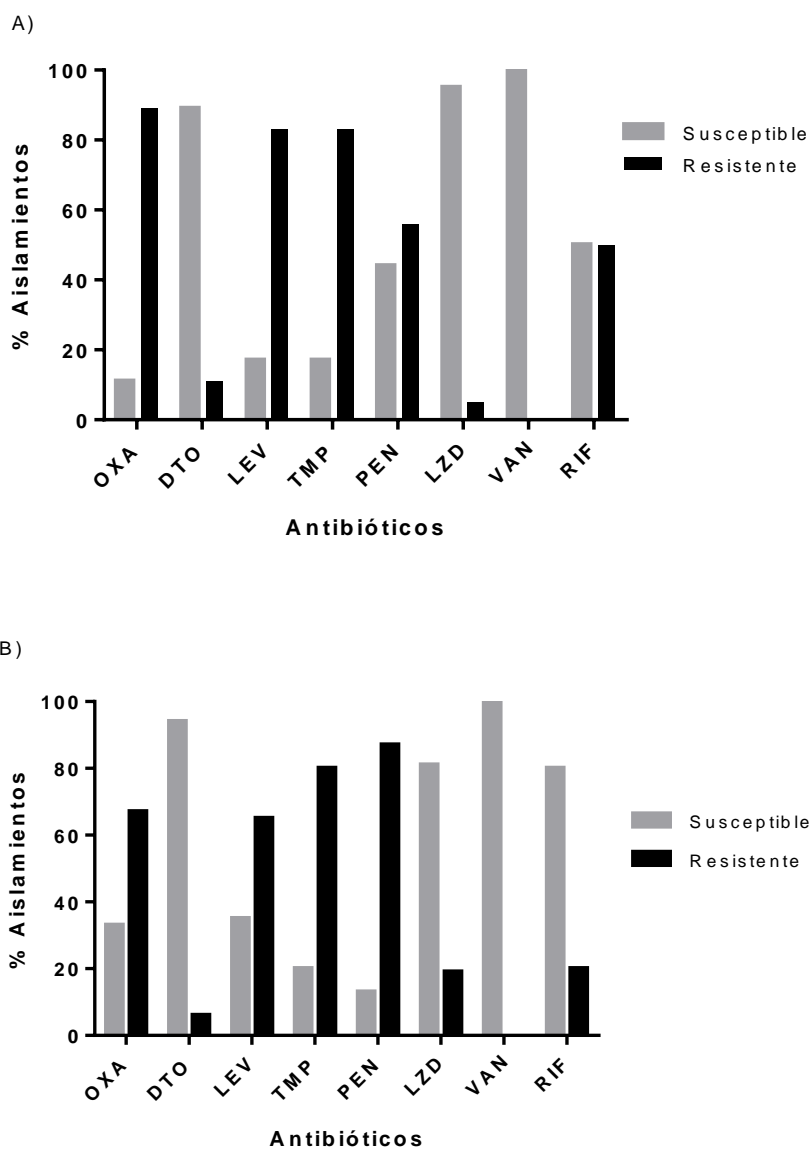


Figura 3. Porcentaje de aislamientos susceptibles y resistentes a antibióticos en células planctónicas. A) *S. haemolyticus* (n=18). B) *S. epidermidis* (n=54). OXA: Oxacilina, DTO: Daptomicina, LEV: Levofloxacino, TMP: Trimetoprim, PEN: Penicilina, LZD: Linezolid, VAN: Vancomicina, RIF: Rifampicina.

7.5 Susceptibilidad en células de biopelícula

En el perfil de susceptibilidad en células de biopelícula, los aislamientos presentaron alta resistencia a los antibióticos, se determinó la CMEB₅₀ y se comparó con la CMI₅₀, se observó que la concentración del antibiótico aumentó hasta 10 veces en las células de biopelícula en comparación con las células planctónicas. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 3. Susceptibilidad a los antibióticos de CoNS ($n=28$) en células de biopelícula.

| Antibiótico | Rango | CMI₅₀ | Rango | CMEB₅₀ | No. veces de aumento |
|--------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------|
| Oxacilina | 0.125 - >32 | 8 | 64 - >2,048 | 1,024 | 7 |
| Penicilina | 0.25 - >32 | 2 | 16 - >2,048 | 2,048 | 10 |
| Levofloxacino | 0.06 - >16 | 8 | 8 - >2,048 | 256 | 5 |
| Rifampicina | <0.06 - >32 | 0.5 | 0.5 - >256 | 32 | 6 |

8. DISCUSIÓN

S. epidermidis y *S. haemolyticus* son dos de las especies de CoNS más frecuentemente aisladas de muestras sanguíneas. Sin embargo, existe poca información reportada sobre el estudio de los factores de virulencia de estas bacterias, como la producción de biopelícula y su papel en la resistencia a los antibióticos. Este trabajo demuestra la importancia del estudio de la producción y composición de la biopelícula de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, ya que ésta aumenta la resistencia a antibióticos.

De los aislamientos de CoNS obtenidos de hemocultivos, se encontró que *S. epidermidis* fue la especie más frecuentemente aislada con un 75.00% (54/72) seguido de *S. haemolyticus*. Diversos estudios reportan que *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* son bacterias comensales, pero también son patógenos causantes de infecciones asociadas a la atención de la salud, ya que se han descrito principalmente en bacteriemias relacionadas con catéter intravenoso y otros dispositivos de uso común dentro del hospital, así como infecciones del torrente sanguíneo. *S. haemolyticus* es el segundo CoNS más frecuentemente aislado después de *S. epidermidis* (Argemi *et al.*, 2019; Veliev & Nakipoglu, 2022).

La Unidad de Cuidados Intensivos fue la sala de donde provenían la mayor parte de los aislamientos (51.38%). Los factores que incrementan la probabilidad de adquirir dichas infecciones incluyen la hospitalización durante periodos prolongados, los procedimientos preoperatorios, la utilización de catéteres o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo como unidades de cuidados intensivos, urgencias, entre otros (Fernández-fernández *et al.*, 2022). Diversos estudios han reportado que la mayor prevalencia de estos patógenos son en pacientes inmunocomprometidos con sistema inmunitario frágil (Eltwisy *et al.*, 2020).

En la práctica clínica, debido a la propiedad de CoNS de colonizar la piel humana, la contaminación de hemocultivos u otras muestras ocurren con frecuencia, por lo que a veces se notifican cultivos falsos positivos, y datos actuales indican que *Staphylococcus epidermidis* es el contaminante más frecuente (Tenderenda *et al.*, 2022). Por lo tanto, el principal obstáculo para dar un diagnóstico es identificar correctamente los casos en los que los CoNS son agentes patógenos en lugar de contaminantes (Michels *et al.*, 2021).

Una limitante de este estudio fue que se desconoce si los aislamientos encontrados son verdaderamente causantes de bacteriemias.

La mayor parte de los aislamientos con los cuales se trabajaron en este estudio provenían de muestras de pacientes jóvenes de 0-20 años. Se ha reportado que los CoNS se encuentran entre los patógenos más frecuentemente aislados en recién nacidos, recién nacidos prematuros y pacientes de edad avanzada, también se observan en pacientes con dispositivos médicos permanentes, pacientes con leucopenia, neutropenia, en tratamiento inmunosupresor y quimioterapia (França *et al.*, 2021). Entre las especies de CoNS, *Staphylococcus epidermidis* es el patógeno más comúnmente aislado en bebés prematuros (Joubert *et al.*, 2022).

Las biopelículas están involucradas en una amplia gama de infecciones por lo que representan un gran desafío clínico, ya que son altamente resistentes a las terapias antimicrobianas y a menudo ocurren en áreas del cuerpo que no son de fácil acceso para el tratamiento (Jamal *et al.*, 2018; Uru *et al.*, 2021). Aproximadamente el 80% de las infecciones microbianas crónicas y recurrentes en humanos son causadas por biopelículas, algunas de las cuales resultan en altas tasas de mortalidad y morbilidad. *S. aureus* y CoNS, principalmente *S. epidermidis*, son los agentes etiológicos más comunes número uno y número tres de las infecciones adquiridas en hospitales en los EE. UU., respectivamente, incluidas las infecciones de dispositivos médicos permanentes y heridas quirúrgicas (Paharik *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2021).

Un factor importante de patogenicidad en la infección por CoNS es la capacidad de las bacterias para colonizar las superficies abióticas de los dispositivos médicos o las superficies bióticas, como el material extraño recubierto con factor del huésped o el tejido del huésped mediante la formación de la biopelícula (Becker *et al.*, 2020). En este trabajo se obtuvieron 40 aislamientos productores de biopelícula, de los cuales el 97.5% (n=39) fueron *S. epidermidis*, de éstos, 53.7% (n=29) fueron productores fuertes y 18.5% (n=10) productores débiles de biopelícula, por otro lado, sólo se encontró 1 aislamiento *S. haemolyticus*, el cual fue productor débil de biopelícula. En estudios previos se han reportado porcentajes similares de aislamientos de CoNS productores de biopelícula, un 42.1% de producción de biopelícula fue reportado por Clin *et al.*, mediante el mismo

método de Christensen (Clin *et al.*, 2021). En otro estudio hecho por Rampelotto *et al.*, entre las especies de CoNS productoras de biopelícula detectadas se encontró alto porcentaje para *S. epidermidis*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (Rampelotto *et al.*, 2018).

Las biopelículas son matrices estructuradas tridimensionales compuestas por bacterias y biopolímeros extracelulares como proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos teicoicos y DNA extracelular (eDNA) (Becker *et al.*, 2020). La formación y el mantenimiento de las biopelículas requieren de estos componentes ya que son responsables de la adhesión a la superficie, la unión celular y la conservación de la arquitectura de la biopelícula. Dichos componentes difieren entre especies; en muchas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, así como en algunos estafilococos, la maduración de la biopelícula se asocia con la producción de exopolisacáridos, que regularmente son el componente principal de la matriz de la biopelícula. La principal clase de exopolisacáridos de la biopelícula en los estafilococos es la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA); se considera que es la adhesina intercelular más importante de los estafilococos y es crucial para la formación de biopelículas y la virulencia en *S. epidermidis* (Schulze *et al.*, 2021). Por el contrario, un estudio de *S. haemolyticus* aislado de infecciones del torrente sanguíneo, mostró que el 66% de los aislados formaron biopelículas, sin embargo, dieron negativo para la PCR del operón *ica* para la síntesis de PIA, lo que sugiere que quizá tiene otros medios de formación de biopelícula (Silva *et al.*, 2013). Las proteínas también son un componente importante ya que se le atribuyen propiedades adhesivas a lo largo de la formación de biopelículas, las proteínas estafilocócicas más destacadas son AtlA/AtlE, que están asociadas a la superficie. Por otro lado, estudios recientes sugieren que el DNA extracelular puede desempeñar un papel más importante que los componentes de la superficie microbiana que reconocen las proteínas de adhesina de las moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM), en el caso de *S. aureus*. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que de los aislamientos analizados la composición de la biopelícula fue heterogénea, sin embargo, el principal componente fueron las proteínas. Aunque estudios previos han reportado que los carbohidratos son el principal componente, esto es muy variable entre bacterias y especies. La información encontrada junto con los resultados

obtenidos en este trabajo sugiere que la composición de la biopelícula de los CoNS suele ser heterogénea, y que los carbohidratos no son el componente principal en todos los casos, además de que existen otras vías genéticas para su formación. Es necesario caracterizar cada uno de los componentes para saber cuáles realmente están involucrados en la formación de la biopelícula.

Varios estudios han demostrado que las bacterias asociadas en biopelículas exhiben una mayor resistencia a los compuestos antimicrobianos que sus contrapartes planctónicas. Aproximadamente un 60% de las infecciones bacterianas que presentan dicha resistencia se asocian a la formación de biopelículas. Se cree que la resistencia a los antibióticos en las infecciones por biopelículas es causada por varios factores, incluidas las alteraciones metabólicas en las bacterias dentro de la biopelícula, disminución de la penetración de antibióticos debido a la matriz extracelular, inactivación del antibiótico por compuestos dentro de la matriz extracelular, efectos del inóculo relacionados con la gran cantidad de bacterias en la biopelícula en relación con las moléculas de antibiótico disponibles y mayor intercambio de mecanismos de resistencia bacteriana a medida que residen las bacterias muy cerca unos de otros. A pesar de tener menor efecto, los antibióticos convencionales se pueden usar para tratar las infecciones asociadas a la biopelícula hasta cierto punto. Sin embargo, la terapia debe evaluarse según la especie bacteriana, la ubicación de la infección y la vía de administración, de lo contrario, el uso ineficaz de los antibióticos aumentará la resistencia a ellos (García *et al.*, 2019; Schulze *et al.*, 2021).

Hay estudios que reportan que la CMEB es generalmente de 100 a 1000 veces mayor que la CMI de bacterias planctónicas (Davidson *et al.*, 2019). En este trabajo, se determinó el CMEB con 4 antibióticos en 28 de los 40 aislamientos productores de biopelícula, y se comparó el CMEB₅₀ con el CMI₅₀ de las células planctónicas, donde se observó que la concentración aumentó hasta 10 veces más en presencia de la biopelícula. Se ha descrito que las biopelículas también utilizan mecanismos de resistencia convencionales a los antibióticos, como las β -lactamasas, la expresión aumentada de bombas de expulsión para eliminar antibióticos intracelulares y la capacidad de transferencia horizontal, sin embargo, hacen falta más estudios respecto a esto.

En los resultados de la susceptibilidad en células planctónicas, se obtuvo una alta resistencia a oxacilina, penicilina, levofloxacino y trimetoprim para ambas especies, y resultados similares se han reportado en diferentes investigaciones donde se observa una alta resistencia de aislamientos CoNS a estos antibióticos (Bora *et al.*, 2018). *S. aureus* y varias especies de CoNS se caracterizan por ser resistentes a la meticilina, lo que, a su vez, les confiere resistencia a varios antibióticos β -lactámicos. En el caso de la resistencia a penicilina se debe principalmente a la producción de enzimas β -lactamasas, por otro lado, oxacilina es una de las penicilinas resistentes a las penicilinasas, ya que posee una estructura molecular que las protege frente a la acción de las β -lactamasas; sin embargo, el elemento genético cromosómico responsable de la resistencia a oxacilina es el gen *mecA* (García *et al.*, 2019). Otros estudios han informado que existe resistencia generalizada a otros antibióticos, incluidos los aminoglucósidos, las quinolonas, los macrólidos y las tetraciclinas, y se ha reportado resistencia a levofloxacino de hasta un 78.9% en aislamientos de CoNS (Stevoska *et al.*, 2022). Por otro lado, en un estudio realizado por Asbell *et al.*, donde determinaron el perfil de resistencia a trimetoprim en CoNS aislados de infecciones oculares, se encontró un 0% de resistencia a este antibiótico. Lo anterior no concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, quizá por el tipo de muestra, diferentes especies e incluso por el mecanismo de resistencia que se desarrolla (Asbell & Id, 2018).

En el caso de la rifampicina, éste es un antibiótico activo contra la mayoría de los aislamientos, sin embargo, existe el riesgo de desarrollar resistencia (Stevoska *et al.*, 2022). En este trabajo, la resistencia a este antibiótico fue baja para ambas especies. Daptomicina es un antibiótico lipopeptídico cíclico que ejerce un efecto bactericida al dirigirse a la membrana celular bacteriana. Análisis *in vitro* de aislamientos clínicos de CoNS han mostrado una susceptibilidad de hasta el 99%. Estos estudios han demostrado que este antibiótico es más eficaz que la vancomicina y el linezolid cuando se administraban solos, sin embargo, aún se espera la evaluación en estudios clínicos, pues a pesar de estos prometedores datos de susceptibilidad, todavía faltan datos clínicos sobre la utilidad de daptomicina en infecciones relacionadas con CoNS (Becker *et al.*, 2020). En este trabajo se obtuvo un 93.0% de susceptibilidad a daptomicina, lo cual concuerda con lo ya reportado.

Hasta el año 2019, la resistencia a linezolid entre CoNS se había informado en varios países, incluidos América del Norte (EEUU., México), y en un estudio realizado por Mittal *et al.*, se analizaron 15 aislamientos de CoNS aislados de pacientes con infección asociada al torrente sanguíneo en el cual se encontró un 100% de resistencia a este antibiótico, detectaron la presencia del gen *cfr*, y presentaban mutaciones en el gen 23s RNAr, lo que le confería la resistencia (Mittal *et al.*, 2019). La resistencia a linezolid ha ido en aumento, y en este trabajo se encontró un 15.3% de resistencia a este antibiótico.

La susceptibilidad a la vancomicina se ha mantenido en su mayor parte. Los aislamientos estudiados en este trabajo presentaron un 100% de susceptibilidad a vancomicina. Por lo tanto, los glicopéptidos se han convertido en la terapia estándar para la infección por CoNS (Stevoska *et al.*, 2022). Hasta el momento no se han reportado tasas de resistencia a vancomicina en México, por lo que sigue siendo el antibiótico más eficaz contra CoNS.

9. CONCLUSIONES

- Dentro de los CoNS obtenidos de sangre en este estudio, predominó *S. epidermidis*.
- La mayoría de los aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* procedían de la unidad de cuidados intensivos, con mayor frecuencia en pacientes jóvenes (0-20 años).
- Más de la mitad de los aislamientos de *S. epidermidis* fueron productores de biopelícula, en contraste con *S. haemolyticus*.
- La composición de biopelícula de los aislamientos fue en gran parte heterogénea, sin embargo, las proteínas fueron el componente más abundante.
- Se presentó alta resistencia a oxacilina y penicilina y nula a vancomicina en ambas especies. Se detectó 15.30% de resistencia a linezolid en Jalisco, principalmente por *S. epidermidis*.
- La producción de biopelícula aumentó la resistencia a oxacilina, levofloxacino, penicilina, y rifampicina hasta 10 veces en comparación con las células planctónicas.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar cada uno de los componentes de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*.
- Determinar los genes involucrados la formación de la biopelícula y su expresión en células planctónicas y en células dentro de la biopelícula .
- Determinar los genes involucrados en la resistencia a los antibióticos y su expresión en células planctónicas y en células dentro de la biopelícula .
- Determinar la capacidad de formación de la biopelícula en distintas superficies.
- Evaluar el efecto de concentraciones subinhibitorias de distintos antibióticos en la formación de la biopelícula .
- Determinar la susceptibilidad a antibióticos en células de biopelícula en ausencia de cada uno de sus componentes.

11.BIBLIOGRAFÍA

- Al-haqan, A., Boswihi, S. S., Pathan, S., & Id, E. E. U. (2020). *Antimicrobial resistance and virulence determinants in coagulase-negative staphylococci isolated mainly from preterm neonates*. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236713>
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews. Microbiology*, *16*(7), 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., & Prévost, G. (2019). Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5), 1215. <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>
- Arias-flores, R., Rosado-quiab, U., & Vargas-valerio, A. (2016). *Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social*. *54*(55).
- Asbell, P. A., & Id, H. H. D. (2018). *Antibiotic resistance among bacterial conjunctival pathogens collected in the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular Microorganisms (ARMOR) surveillance study*. 1–17.
- Becker, K., Both, A., Weißelberg, S., Heilmann, C., & Rohde, H. (2020). Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *18*(4), 349–366. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1730813>
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Bora, P., Datta, P., Gupta, V., Singhal, L., & Chander, J. (2018). *susceptibility of coagulase - negative staphylococci isolated from clinical samples*. <https://doi.org/10.4103/JLP.JLP>
- Brown, M. M., & Alexander, R. H. (2020). *Staphylococcus epidermidis — Skin friend or foe ?* 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009026>

- Bukowski, M., Władyka, B., Dubin, A., & Dubin, G. (2018). *Chapter 10 - The Staphylococcal Exfoliative Toxins* (V. B. T.-P.-T.-M. T. S. Savini (ed.); pp. 127–133). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00010-8>
- Caputo, P., Di Martino, M. C., Perfetto, B., Iovino, F., & Donnarumma, G. (2018). Use of MALDI-TOF MS to discriminate between biofilm-producer and non-producer strains of staphylococcus epidermidis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph15081695>
- Christensen, G., Simpson, G., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D., & Beachey, E. (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.
- Clin, A., Antimicrob, M., Manandhar, S., Singh, A., Varma, A., Pandey, S., & Shrivastava, N. (2021). Phenotypic and genotypic characterization of biofilm producing clinical coagulase negative staphylococci from Nepal and their antibiotic susceptibility pattern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00447-6>
- CLSI. (2022). *M100 Performance Standards for Antimicrobial*.
- Davidson, D. J., Spratt, D., & Liddle, A. D. (2019). *Implant materials and prosthetic joint infection : the battle with the biofilm*. 4(November). <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180095>
- Diot, A., Dyon-tafari, V., Bergot, M., Tasse, J., Martins-sim, P., & Valour, F. (2020). *Investigation of a Staphylococcus argenteus Strain Involved in a Chronic Prosthetic-Joint Infection*. 1–16.
- Dong, Y., Speer, C. P., & Glaser, K. (2018). Beyond sepsis: Staphylococcus epidermidis is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*, *9*(1), 621–633. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419117>
- Eltwisy, H. O., Abdel-fattah, M., Elsisy, A. M., Omar, M. M., & Aly, A. (2020).

Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cells. *Virulence*, 11(1), 1142–1157.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809962>

Fernández-fernández, R., Lozano, C., Eguizábal, P., Ruiz-ripa, L., Martínez-álvarez, S., Abdullahi, I. N., Zarazaga, M., & Torres, C. (2022). *Bacteriocin-Like Inhibitory Substances in Staphylococci of Different Origins and Species With Activity Against Relevant Pathogens*. 13(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870510>

França, A., Gaio, V., Lopes, N., & Melo, D. R. (2021). *Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci*.

Frickmann, H., Hahn, A., Skusa, R., Mund, N., Viehweger, V., Köller, T., Köller, K., Schwarz, N. G., Becker, K., Warnke, P., & Podbielski, A. (2018). Comparison of the etiological relevance of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(8), 1539–1545. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3282-y>

García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Antonio, M., Herrera, R., & Giono, S. (2019). *Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de Staphylococcus aureus y Staphylococcus coagulasa negativa en México*. 513–523.

Gostev, V., Leyn, S., Kruglov, A., Likholetova, D., Kalinogorskaya, O., Baykina, M., Dmitrieva, N., Grigorievskaya, Z., & Lee, A. H. (2021). *Global Expansion of Coagulase-Negative Staphylococci*. 12(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661798>

Heilmann, C., Ziebuhr, W., & Becker, K. (2019). Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection*, 25(9), 1071–1080. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., & Williams, C. (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and

treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 Suppl 1, S1-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>

Ibrahim, Y. M., & Abu El-Wafa, W. M. (2020). Evaluation of fosfomycin combined with vancomycin against vancomycin-resistant coagulase negative staphylococci. *Journal of Chemotherapy*, 32(8), 411–419. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1761638>

Id, G., Dube, F., Moonsamy, R., Mankahla, A., Hlela, C., Levin, M. E., Lunjani, N., Id, A., & O, S. (2022). *Skin and nasal colonization of coagulase- negative staphylococci are associated with atopic dermatitis among South African toddlers*. 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265326>

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

Joubert, I. A., Otto, M., Strunk, T., & Currie, A. J. (2022). *Look Who 's Talking : Host and Pathogen Drivers of Staphylococcus epidermidis Virulence in Neonatal Sepsis*.

Kosecka-Strojek, M., Buda, A., & Międzobrodzki, J. (2018). *Chapter 2 - Staphylococcal Ecology and Epidemiology* (V. B. T.-P.-T.-M. T. S. Savini (ed.); pp. 11–24). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00002-9>

Lepidi, A. (2018). *Chapter 12 - Staphylococcal Lipases* (V. B. T.-P.-T.-M. T. S. Savini (ed.); pp. 147–159). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00012-1>

Linke, S., Thürmer, A., Bienger, K., Kleber, C., Bellova, P., & Lützner, J. (2022). Microbiological pathogen analysis in native versus periprosthetic joint infections : a retrospective study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02850-3>

- Lisowska-łysiak, K., Lauterbach, R., & Międzobrodzki, J. (2021). *Epidemiology and Pathogenesis of Staphylococcus Bloodstream Infections in Humans : a Review*. 70(1), 13–23.
- Lo, C. I., Fall, B., Sambe-ba, B., Diawara, S., & Gueye, M. W. (2015). *MALDI-TOF Mass Spectrometry : A Powerful Tool for Clinical Microbiology at Hôpital Principal de Dakar , Senegal (West Africa)*. 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145889>
- Madigan MT, Martinko JM, P. J. (2015). *Brock Biología de los Microorganismos*.
- Matrat, L., Plaisant, F., Barreto, C., Claris, O., & Butin, M. (2020). *Increasing use of linezolid in a tertiary NICU during a 10-year period : reasons and concerns for the future*. 2, 1–8.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39–50.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- Mendoza, S., Morfín, R., Villarreal, L., Rodríguez, E., Llaca, J., Camacho, A., González, G., N, C., & Garza, E. (2015). Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of Staphylococcus hominis Isolates from Blood. *PLoS ONE*, 10(12), 1–13.
- Michalik, M., Samet, A., Podbielska-Kubera, A., Savini, V., Międzobrodzki, J., & Kosecka-Strojek, M. (2020). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: A review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12941-020-00367-x>
- Michels, R., Last, K., & Becker, S. L. (2021). *Update on Coagulase-Negative Staphylococci — What the Clinician Should Know*.
- Mirzaei, R., Yousef, M., Renata, C., Sedighi, I., Yousefimashouf, R., & Pooshang, K. (2022). Biomedicine & Pharmacotherapy Prevention , inhibition , and degradation

effects of melittin alone and in combination with vancomycin and rifampin against strong biofilm producer strains of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147(January), 112670.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112670>

Mittal, G., Bhandari, V., Gaiind, R., Rani, V., Chopra, S., Dawar, R., Sardana, R., & Verma, P. K. (2019). *Linezolid resistant coagulase negative staphylococci (LRCoNS) with novel mutations causing blood stream infections (BSI) in India*. 1–8.

Otto, M. (2018). Staphylococcal Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023–2018.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>

Paharik, A. E., Horswill, A. R., Roy, J., & City, I. (2016). *The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response*. 4(2), 1–48.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015>

Pinheiro, L., Brito, C. I., de Oliveira, A., Martins, P. Y. F., Pereira, V. C., & da Cunha, M. de L. R. de S. (2015). *Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus: Molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes*. *Toxins*, 7(9), 3688–3699. <https://doi.org/10.3390/toxins7093688>

Rampelotto, R. F., Lorenzoni, V. V., Silva, C., Coelho, S. S., Wust, V., & Garzon, L. R. (2018). *Major Article Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns*. 51(6), 761–767. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0171-2018>

Sarkar, S. (2020). Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6549–6564. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10687-9>

Sartelli, M., Mckimm, J., & Bakar, M. A. (2018). *Health care-associated infections – an overview*. 2321–2333.

Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. (2021). *Biofilms by bacterial human*

*pathogens : Clinical relevance - development , composition and regulation -
therapeutical strategies.* 8(2), 28–56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>

- Silva, P. V., Cruz, R. S., Keim, L. S., Paula, G. R. De, Teixeira, B., Carvalho, F.,
Coelho, L. R., Cícera, M., Mauricio, J., Marie, A., Figueiredo, S., & Teixeira, L. A.
(2013). *The antimicrobial susceptibility , biofilm formation and genotypic profiles
of Staphylococcus haemolyticus from bloodstream infections.* 108(September),
812–816. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013022>
- Stach, N., Kaszycki, P., Władyka, B., & Dubin, G. (2018). *Chapter 11 - Extracellular
Proteases of Staphylococcus spp.* (V. B. T.-P.-T.-M. T. S. Savini (ed.); pp. 135–
145). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-
1.00011-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00011-X)
- Stevoska, S., Himmelbauer, F., Stiftinger, J., Stadler, C., Gotterbarm, T., Heyse, T. J., &
Klasan, A. (2022). Significance Difference in Antimicrobial Resistance of
Coagulase Negative Periprosthetic Joint Infection in Septic Revision Total Knee
Arthroplasty Between Two Major Orthopedic Centers. *The Journal of Arthroplasty*,
37(6), S306–S312. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2021.11.017>
- Tenderenda, A., Łysakowska, M., & Dargiewicz, R. (2022). *Blood Culture
Contamination : A Single General Hospital Experience of 2-Year Retrospective
Study.*
- Uru, C., Chopo-escuin, G., Tommassen, J., & Mainar-jaime, R. C. (2021). *Biofilms as
Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance.* 1–36.
- Veliev, A., & Nakipoglu, Y. (2022). *Investigation of Staphylococcus lugdunensis and
Selected Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Blood Culture bottles
and Determination of their Sensitivities to Antibiotics.* April.
- Williams, M. C., Dominguez, S. R., Prinzi, A., Lee, K., & Parker, S. K. (2020).
*Reliability of mecA in Predicting Phenotypic Susceptibilities of Coagulase-
Negative Staphylococci and Staphylococcus aureus.* 1–4.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa553>

- Wojtyczka, R. D., Zięba, A., Dziedzic, A., Kępa, M., & Idzik, D. (2015). An activity of thioacyl derivatives of 4-aminoquinolinium salts towards biofilm producing and planktonic forms of coagulase-negative staphylococci. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/725939>
- Ye, Y., Tian, Y., Kong, Y., & Ma, J. (2020). *Trends of Antimicrobial Susceptibility in Clinically Significant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Cerebrospinal Fluid Cultures in Neurosurgical Adults : a Nine-Year Analysis*. 10(1), 1–8.
- Zhang, Y., Cheng, M., Zhang, H., Dai, J., Guo, Z., Li, X., Ji, Y., Cai, R., Xi, H., Wang, X., Xue, Y., Sun, C., Feng, X., Lei, L., Han, W., & Gu, J. (2018). Antibacterial effects of phage lysin LysGH15 on planktonic cells and biofilms of diverse staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(15), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00886-18>