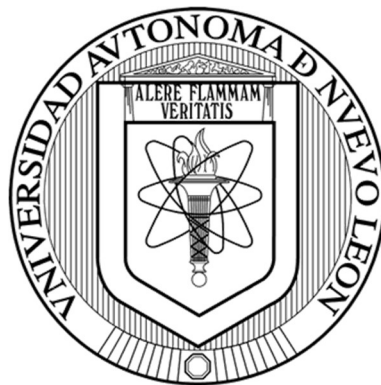


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA
FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *Staphylococcus hominis*

Por:

M.C. VERÓNICA VILLARREAL SALAZAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2022

**“EFECTO MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS ANTIBIÓTICOS EN
LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *Staphylococcus hominis*”**

Comité de Tesis



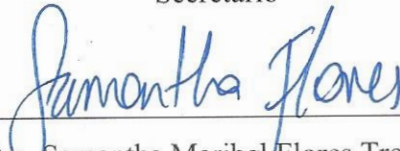
Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Secretario



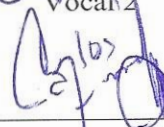
Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Vocal 1



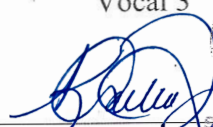
Dr. Adrián Camacho Ortiz

Vocal 2



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Vocal 3



DIRECCIÓN
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de posgrado

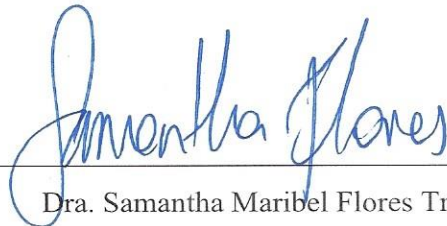
**“EFECTO MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS ANTIBIÓTICOS EN
LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *Staphylococcus hominis*”**

Dirección de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño

Director interno



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Director externo

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.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-S-16392 y el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL 2019: SA800-19, 2020: CN1212-20 y 2021: SA1587-21.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A la **Dra. Samantha Maribel Flores Treviño** por su excelente asesoramiento, disponibilidad, paciencia, todos sus consejos y valiosa enseñanza, mil gracias.

A la **Dra. Paola Bocanegra Ibarias** y **Dr. Daniel Salas Treviño** por todo el conocimiento, disponibilidad y apoyo brindado.

Al la **Dra. Elvira Garza González**, por todas las enseñanzas y conocimientos brindados.

Al **Dr. Juan F. Contreras Cordero**, **Dr. Carlos Hernández Luna**, y la **Dr. Adrián Camacho Ortiz** por formar parte del comité de este trabajo, su apoyo y colaboración.

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

A mis amigos y compañeros de posgrado: **Edeer Montoya**, **Aurora Luna**, **Rodrigo Pérez**, **Samantha Villarreal**, **Edith Delgado**, **Mauricio del Rio**, **Armine Darwich**, **Laura Tijerina** y **Jessica Gutiérrez** por los gratos momentos juntos, todo su apoyo, consejos, opiniones y brindarme sus experiencias.

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

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

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

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

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

DEDICATORIA

A mi mamá y mi tía

ÍNDICE
CONTENIDO

	PÁGINA
PORTADA	i
HOJA DE FIRMAS	ii
ÍNDICE	iii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades y hábitat de <i>Staphylococcus</i> spp.....	3
2.2 Características generales de <i>Staphylococcus hominis</i>	3
2.3 Importancia clínica.....	4
2.4 Patogenicidad y factores de virulencia	5
2.4.1 Características de la biopelícula.....	6
2.5 Resistencia a los antibióticos	8
2.6 Efecto de los antibióticos sobre la biopelícula.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Aislamientos clínicos.....	17
6.2 Identificación.....	17
6.2.1 Determinación de la subespecie	18
6.3 Detección de genes asociados a la resistencia a antibióticos y formación de biopelícula	18
6.3.1 Extracción de ADN.....	18
6.3.2 Genes asociados a formación de la biopelícula	19
6.3.3 Detección de genes asociados a la resistencia a antibióticos.....	20
6.4 Nivel de producción de biopelícula.....	21
6.5 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos.....	22
6.5.1 Preparación de los antibióticos.....	22

6.5.2	Susceptibilidad en células planctónicas	22
6.5.3	Susceptibilidad en células de la biopelícula	23
6.6	Nivel de producción de biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos.....	24
6.6.1	Células planctónicas.....	24
6.6.2	Células de la biopelícula.....	25
6.7	Composición de la biopelícula por ensayos de desprendimiento	26
6.7.1	Sin antibiótico	26
6.7.2	Con antibióticos	27
6.8	Visualización de la estructura de la biopelícula	29
6.8.1	Sin antibióticos.....	29
6.8.2	Con antibióticos	30
7.	RESULTADOS.....	32
7.1	Identificación.....	32
7.2	Nivel de producción de biopelícula.....	32
7.3	Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula.....	33
7.4	Nivel de producción de la biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos.....	34
7.4.1	Células planctónicas.....	36
7.4.2	Células de la biopelícula.....	36
7.5	Composición de la biopelícula por ensayos de desprendimiento	39
7.5.1	Composición de la biopelícula sin antibióticos	39
7.5.2	Composición de la biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos	40
7.6	Estructura de la biopelícula por microscopía.....	45
7.6.1	Células planctónicas.....	46
7.6.2	Células de la biopelícula.....	47
7.7	Detección de genes asociados a la formación de la biopelícula y resistencia a los antibióticos.....	48
8.	DISCUSIÓN	50
9.	CONCLUSIONES	60
10.	PERSPECTIVAS	61
11.	BIBLIOGRAFÍA	62
12.	ANEXOS	72

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Efecto de concentraciones subinhibitorias de distintas clases de antibióticos sobre la biopelícula en <i>Staphylococcus</i> spp.....	13
Tabla 2. Iniciadores de los genes relacionados a la formación de la biopelícula.....	20
Tabla 3. Iniciadores de los genes asociados a la resistencia a antibióticos.....	21
Tabla 4. Concentraciones subCMI y subCMEB utilizadas para determinar la producción y composición de la biopelícula en <i>S. hominis</i>	35
Tabla 5. Genes asociados a farmacorresistencia, producción de biopelícula y concordancia con el perfil de susceptibilidad y formación de biopelícula.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Nivel de producción de biopelícula en <i>S. hominis</i>. Frecuencia de los aislamientos en porcentaje del nivel de producción de biopelícula mediante la tinción con cristal violeta.....	32
Figura 2. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas. La frecuencia de aislamientos susceptibles, intermedios y resistentes a los antibióticos se determinó mediante microdilución en células planctónicas de <i>S. hominis</i> . LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacin, OXA: oxacilina, DAP: daptomicina, RIF: rifampicina.....	33
Figura 3. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula. La frecuencia de aislamientos susceptibles y resistentes a los antibióticos se determinó mediante microdilución utilizando el dispositivo Calgary en células de la biopelícula de <i>S. hominis</i> . LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacin, OXA: oxacilina, RIF: rifampicina.....	34
Figura 4. Nivel de producción de la biopelícula con subCMI en <i>S. hominis</i>. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta de cada tratamiento sin y con subCMI en tres aislamientos de <i>S. hominis</i> (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 fue determinada en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacin, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con <i>post hoc</i> de Dunnet comparando los tratamientos con subCMI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$	37
Figura 5. Nivel de producción de la biopelícula con subCMEB en <i>S. hominis</i>. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta de cada tratamiento sin y con subCMEB en tres aislamientos de <i>S. hominis</i> (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacin, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con <i>post hoc</i> de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$	38
Figura 6. Composición de la biopelícula de aislamientos de <i>S. hominis</i>. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta de cada componente después del tratamiento con proteinasa k para desprender proteínas, metaperyodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN de cada aislamiento productor de biopelícula se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia.....	39

Figura 7. Composición de la biopelícula de *S. hominis*. El porcentaje de desprendimiento de cada componente se calculó comparando el control contra el tratamiento para desprender cada componente utilizando proteinasa k para proteínas, metaperyodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN.....40

Figura 8. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta con subCMI en tres aislamientos de *S. hominis* (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 de cada componente después del tratamiento con proteinasa k para desprender proteínas, metaperyodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN de cada aislamiento productor de biopelícula se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$42

Figura 9. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta con subCMEB en tres aislamientos de *S. hominis* (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 de cada componente después del tratamiento con proteinasa k para desprender proteínas, metaperyodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN de los aislamientos seleccionados productores de biopelícula se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$44

Figura 10. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad integrada del análisis de las micrografías con subCMI en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211) de cada componente después del marcaje con Sypro Ruby para proteínas, WGA con Alexa fluor 488 para carbohidratos y DAPI para ADN del aislamiento productor de biopelícula se determinó con un microscopio de fluorescencia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$45

Figura 11. Composición de la biopelícula de un aislamiento de *S. hominis* con antibióticos. Imágenes representativas con diferencias significativas comparando el control y los tratamientos con subCMI por microscopia de fluorescencia en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211). En azul se observa el marcaje de ADN con DAPI, en verde el marcaje de carbohidratos con WGA conjugado con Alexa fuor 488 y en anaranjado las proteínas macadas con Sypro Ruby. La significancia estadística se determinó mediante

ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$46

Figura 12. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad integrada del análisis de las micrografías de con subCMEB en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211) de cada componente después del marcaje con Sypro Ruby para proteínas, WGA con Alexa fluor 488 para carbohidratos y DAPI para ADN del aislamiento productor de biopelícula se determinó con un microscopio de fluorescencia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$47

Figura 13. Composición de la biopelícula de un aislamiento de *S. hominis* con antibióticos. Imágenes representativas con diferencias significativas comparando el control y los tratamientos con subCMEB por microscopia de fluorescencia en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211). En azul se observa el marcaje de ADN con DAPI, en verde el marcaje de carbohidratos con WGA conjugado con Alexa fluor 488 y en anaranjado las proteínas macadas con Sypro Ruby. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$48

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

- CLSI** · instituto de estándares clínicos y de laboratorio
- CMEB** · concentración mínima de erradicación de biopelícula
- CMI** · concentración mínima inhibitoria
- CST** · caldo soya tripticasa
- DAPI** · 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DO** · densidad óptica
- ECN** · estafilococos coagulasa negativa
- MALDI-TOF MS** · espectrometría de masas a través de la desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo
- PBP2a** · proteína de unión a penicilina alterada
- PBS** · buffer salino de fosfatos
- PIA** · adhesina intracelular de polisacárido
- PNAG** · poli-N-acetil-D-glucosamina
- SDS** · dodecilsulfato sódico
- SHH** · *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis*
- SHN** · *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*
- subCMEB** · concentración subinhibitoria de erradicación de la biopelícula
- subCMI** · concentración subinhibitoria
- TBE** · buffer tris borato EDTA
- TE** · buffer tris con EDTA
- WGA** · aglutinina de germen de trigo

RESUMEN

Staphylococcus hominis es miembro del grupo de los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN). Es comensal en piel de humanos y animales sanos, considerado un patógeno oportunista causante de bacteriemias nosocomiales relacionadas al uso de dispositivos médicos invasivos. Este tipo de infecciones están asociadas a la formación de la biopelícula que a su vez se ha relacionado con un incremento en la farmacorresistencia, ya que resulta en la incapacidad del antibiótico en penetrar a todas las áreas de la biopelícula y eliminar adecuadamente las células bacterianas. Por esta razón las bacterias están expuestas a concentraciones subinhibitorias de antibióticos que no son capaz de eliminarlas, pero las puede alterar. Sin embargo, aún no se conoce el efecto que tienen las concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre estos parámetros en *S. hominis*. La identificación a nivel especie se llevó a cabo mediante MALDI-TOF MS. Las subespecies se clasificaron mediante la resistencia a novobiocina. Se evaluó la formación de biopelícula mediante la tinción con cristal violeta con y sin concentraciones subinhibitorias de antibióticos. La susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula se determinó mediante microdilución y utilizando el dispositivo Calgary, respectivamente. La composición de la biopelícula se estableció mediante ensayos de desprendimiento con y sin concentraciones subinhibitorias de antibióticos. La visualización de los componentes de la biopelícula se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia con y sin concentraciones subinhibitorias de antibióticos. La detección de los genes asociados a la formación de biopelícula y farmacorresistencia se llevó a cabo mediante PCR punto final. Se incluyeron 90 aislamientos de *S. hominis*, de los cuales el 94% se clasificó como *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH). El 38.88% de los aislamientos son productores de biopelícula. La resistencia a antibióticos fue de al menos dos y hasta diez veces mayor en células de biopelícula a comparación de células planctónicas para linezolid, vancomicina, oxacilina, trimetoprima y levofloxacina. La resistencia a oxacilina y trimetoprima fue mayor a un 70% en células planctónicas. No se observó resistencia a vancomicina, daptomicina y rifampicina en células planctónicas. Rifampicina fue el único antibiótico efectivo en la erradicación de la biopelícula. La composición de la biopelícula fue heterogénea y el mayor componente fueron las proteínas (> 80%), seguido de carbohidratos y DNA

extracelular. Concentraciones subinhibitorias de antibióticos tanto antes como después de la formación de la biopelícula afectan de manera variable dependiendo del aislamiento, antibiótico y concentración tanto como aumento o disminución, así como en su composición. Se encontró una concordancia del 98.88% para la resistencia a oxacilina y la presencia del gen *mecA* y una concordancia del 100% con la resistencia a linezolid y la presencia del gen *cfr*. La producción de biopelícula de aislamientos clínicos de *S. hominis* potencian la resistencia a la mayoría de los antibióticos probados. La producción de biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos se vio afectada individualmente. La composición de la biopelícula aumentó o disminuyó la proporción los componentes con concentraciones subinhibitorias de antibióticos tanto antes como después de la formación de la biopelícula, aunque las proteínas fueron el componente principal. Una mejor comprensión de estos efectos ayudará a mejorar la dosificación de antibióticos y desarrollar otras opciones terapéuticas.

ABSTRACT

Staphylococcus hominis is an opportunistic pathogen member of the group of Coagulase Negative Staphylococci, causing infections related to medical devices; This is associated with various virulence factors, mainly biofilm formation, which protects the bacteria from the external environment, including antibiotics. Due to the low permeability of compounds through the biofilm, it is common for bacteria to be exposed to sub-inhibitory concentrations of antibiotics that can affect bacterial cells but are not capable of eliminating them. The aim of this work was to determine the components of the *S. hominis* biofilm and the effect that subinhibitory concentrations of biofilm structure and composition. Identification at the species level was carried out by MALDI-TOF MS. The subspecies were classified by resistance to novobiocin. Biofilm formation was evaluated by crystal violet staining with and without subinhibitory concentrations of antibiotics. Susceptibility to antibiotics in planktonic and biofilm cells was determined by microdilution method and using the Calgary device, respectively. The composition of the biofilm was established by detachment assays with and without subinhibitory concentrations of antibiotics. The visualization of the biofilm components was performed by fluorescence microscopy with and without subinhibitory concentrations of antibiotics. The biofilm formation and antibiotic resistant genes was detected by end-point PCR. A total of 90 *S. hominis* isolates were included, of which 94% were classified as *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH). Thirty-nine percent of the isolates were classified as biofilm producers. Antibiotic resistance was at least two and up to ten times higher in biofilms cells compared to planktonic cells for linezolid, vancomycin, oxacillin, trimethoprim, and levofloxacin. Resistance to oxacillin and trimethoprim was more than 70% in planktonic cells. Resistance to vancomycin, daptomycin, and rifampicin was not observed in planktonic cells. Rifampicin was the only effective antibiotic in the eradication of the biofilm. The composition of the biofilm was heterogeneous, and the main component was proteins (> 80%), followed by carbohydrates and extracellular DNA. Subinhibitory concentrations of antibiotics before and after biofilm formation has a variable effect depending on the isolate, antibiotic and concentration in increase or decrease biofilm formation as well as biofilm composition. A 98.88% agreement was found for resistance to oxacillin and the presence of *mecA* and 100% agreement with linezolid resistance and

the presence of the *cfi* gene. Biofilm production of *S. hominis* clinical isolates enhance resistance to most of the antibiotics tested. Biofilm production with subinhibitory concentrations of antibiotics was individually affected. The composition of the biofilm increased or decreased the proportion of components with subinhibitory concentrations of antibiotics before and after biofilm formation, although proteins were the main component. A better understanding of these effects will help improve antibiotic dosing and develop other therapeutic options.

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus hominis forma parte del grupo de los estafilococos coagulasa negativos (ECN), los cuales son comensales de la piel en humanos y animales sanos. Dentro de este grupo, *S. hominis* es la tercera bacteria más frecuentemente aislada a partir de especímenes clínicos. De igual manera que otras especies del grupo de los ECN, causa infecciones como patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. Se ha establecido a *S. hominis* como el agente etiológico de diversos tipos de infecciones intrahospitalarias, la mayoría de ellas relacionadas con el uso de dispositivos médicos invasivos, principalmente bacteriemias relacionadas a catéter (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013; Ruiz-Giardin *et al.*, 2019)

Una gran parte de las infecciones causadas por ECN se asocian con la formación de biopelícula, una matriz polimérica que ayuda a la adhesión de la bacteria a superficies inertes o a las células del hospedador, debido a que es el evento crítico para establecer la colonización y causar la infección. Diversas investigaciones han establecido que el incremento de la resistencia a antibióticos en las células de la biopelícula es hasta 1,000 veces mayor a comparación de las células libres o en su estado planctónico (D. Sharma *et al.*, 2019); esto se ha asociado a mecanismos de resistencia moleculares, al estado fisiológico de las células dentro de la biopelícula y a las características estructurales de la biopelícula que limitan la difusión y actividad de agentes antimicrobianos (Skander Hathroubi, 2017).

Para que un antibiótico pueda atravesar la biopelícula, va a depender de las características estructurales de la matriz dadas por su composición entre los cuales se incluyen principalmente carbohidratos, proteínas y ADN extracelular en distintas proporciones, así como de la naturaleza del antibiótico. En *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se ha reportado que el componente principal de la biopelícula son los carbohidratos (Maira-Litrán *et al.*, 2002), en *Staphylococcus lugdunensis* se ha reportado que las proteínas son el componente en mayor abundancia aunque en algunos aislamientos pueden tener una proporción similar a los polisacáridos (Ravaioli *et al.*, 2020). En *S. hominis* se ha reportado una composición heterogénea de la composición de la biopelícula, predominando las proteínas, aunque la proporción varía entre aislamientos

(Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015). Sin embargo, son pocos los reportes sobre la composición de la biopelícula de esta bacteria.

Al ser la biopelícula una barrera de protección, las bacterias que se encuentran en el interior estén expuestas a concentraciones subinhibitorias del antibiótico que no son capaces de eliminar a la bacteria, pero pueden afectarla. Existen reportes donde se demuestra que concentraciones subinhibitorias de distintos antibióticos modifican la expresión de genes de virulencia de *S. aureus* y *S. epidermidis*, tales como toxinas, enzimas, proteínas reguladoras, moléculas de adhesión, entre otras (Stoitsova, 2016; Szczuka *et al.*, 2017). Sin embargo, estos hallazgos no han sido descritos en cepas de *S. hominis*.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar los componentes estructurales de la biopelícula producida por aislamientos clínicos de *S. hominis* y el efecto que tienen distintas concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre el nivel de producción y composición de ésta. Conocer los componentes y los cambios que la bacteria genera para contrarrestar los efectos del antibiótico enfocados a la modificación de los componentes de la biopelícula y el nivel de producción es el inicio para poder generar estrategias efectivas para la erradicación de la biopelícula antes o después de su formación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades y hábitat de *Staphylococcus* spp.

Los estafilococos son miembros de la familia *Staphylococaceae*, caracterizados por ser bacterias esféricas denominadas cocos, agrupados de forma individual, pares, tétradas, racimos, aunque en ocasiones se pueden encontrar en cadenas cortas de 3–4 células. Son bacterias Gram positivas, inmóviles, catalasa positiva y oxidasa negativa. El género de *Staphylococcus* se encuentra distribuido en la piel y mucosas de humanos y animales sanos como comensales formando parte del microbiota natural (Schleifer & Bell).

El 20% de la población está colonizada con *Staphylococcus aureus*: la nariz es el sitio más importante, aunque también puede encontrarse en la faringe, axila, manos, pecho y abdomen. *Staphylococcus epidermidis* es la especie más frecuentemente aislada de la piel, colonizando predominantemente nariz, axilas y cabeza. Otra especie que comúnmente coloniza a humanos es *Staphylococcus hominis* que se ha encontrado en la mayor parte del cuerpo (M. Otto, 2010).

Las distintas especies del género *Staphylococcus* están divididas en dos grandes grupos basados en la habilidad de producir la enzima coagulasa, la cual activa una vía alterna para convertir la fibrina en fibrinógeno dando como resultado la coagulación del plasma sanguíneo (Crosby *et al.*, 2016). Las especies que producen la enzima coagulasa son nombradas coagulasa positivos, y en este grupo se incluye *S. aureus* como patógeno verdadero en humanos. Las especies no productoras de esta enzima son designadas como estafilococos coagulasa Negativa (ECN), considerados patógenos oportunistas y conformado por un grupo heterogéneo en el cual se han descrito más de 50 especies, de las cuales seis están asociadas con una mayor significancia clínica, *S. epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus lugdunensis* (Michels *et al.*, 2021).

2.2 Características generales de *Staphylococcus hominis*

S. hominis se distribuye a lo largo de la piel en humanos sanos siendo la segunda especie más frecuentemente aislada seguida de *S. epidermidis* (Severn *et al.*, 2022). Se ha

encontrado principalmente en zonas de alta humedad, como axilas y región púbica, así como en la cabeza, brazos y piernas. (Wesley E. Kloos *et al.*, 1998; M. Otto, 2010).

Esta bacteria no necesita de medios especiales para su aislamiento, crece satisfactoriamente en medios de composición simple como agar nutritivo o agar soya tripticaseína, siendo este último el preferido. También crece en medios enriquecidos como agar sangre pudiendo diferenciar cepas hemolíticas. El rango de crecimiento varía desde 20 hasta 45 °C, con una temperatura óptima de 35–37°C. Las colonias varían en coloración de blanquecinas a amarillas y en algunos casos presentan un pigmento amarillento en el centro de las colonias. Las colonias con un tiempo de incubación mayor a 48 h suelen tener anillos concéntricos de color claro a oscuro. Las colonias son de pequeñas a medianas entre 3 y 5 mm, lisas, de apariencia opacas con bordes enteros, cremosas, con poca o nula elevación y en agar sangre presentan β -hemólisis variable. Aeróbicamente *S. hominis* produce ácido a partir de distintos carbohidratos como la glucosa, maltosa y fructosa. Esta bacteria presenta baja tolerancia a sales (NaCl) y poca utilización del manitol, por lo cual el medio selectivo y diferencial de Sal y Manitol para *Estafilococos* no es recomendado (Wesley E. Kloos *et al.*, 1998; Wesley E. Kloos & Schleifer, 1975)

Esta bacteria cuenta con dos subespecies: *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH) y *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (SHN) caracterizadas por primera vez por Kloss y colaboradores en 1998. SHN puede distinguirse de SHH principalmente por la resistencia a novobiocina. Además, también se ha reportado que SHN no produce ácido aeróbicamente a partir de la D-trehalosa y N-acetilglucosamina mientras que SHH si lo produce (Wesley E. Kloos *et al.*, 1998).

2.3 Importancia clínica

Hace más de 60 años Smith y colaboradores notaron el potencial patogénico de los ECN al recolectar datos de pacientes con bacteriemia (Smith *et al.*, 1958). En un principio se pensaba que los ECN solo eran contaminantes de las muestras y solo se consideraba a *S. aureus* como el único patógeno verdadero del género *Staphylococcus* spp. sin embargo, con el paso de los años, nuevas las técnicas de identificación con mayor sensibilidad y especificidad aumentaron la credibilidad de los ECN como los agentes etiológicos de

diversas infecciones (Becker *et al.*, 2014). Alrededor de los años ochenta, las infecciones que se sospechaba eran causadas por ECN, especialmente por *S. epidermidis*, incluían principalmente bacteriemias, endocarditis, osteomielitis, , infecciones de tejidos blandos, infecciones asociadas a dispositivos médicos, infecciones del tracto urinario, entre otras (W. E. Kloos & Bannerman, 1994).

En las últimas dos décadas los avances en métodos fenotípicos y moleculares, incluyendo la secuenciación genómica y espectrometría de masas, han dado lugar a una más confiable y verdadera identificación de los integrantes del grupo de los ECN, relacionándolos como los verdaderos agentes etiológicos de las distintas infecciones. En la actualidad se reconocen seis especies con significancia clínica, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, , *S. hominis*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus lugdunensis* (Becker *et al.*, 2014; Michels *et al.*, 2021).

S. hominis recientemente se ha reportado como la tercera especie más frecuentemente aislada a partir de especímenes clínicos, asociado principalmente a bacteriemias (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013; Szemraj *et al.*, 2020). También, esta bacteria está asociada a infecciones relacionadas a dispositivos médicos invasivos como catéter venoso central, implantes de rodilla, e injertos (Holger Rohde *et al.*, 2006; Sorlozano *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha encontrado como el agente causal en casos de endocarditis, endoftalmítis, peritonitis, y osteomielitis (Ruiz de Gopegui *et al.*, 2011; Szczuka *et al.*, 2018).

Entre los factores de riesgo que predisponen al paciente a infecciones por *S. hominis* u otros ECN son los pacientes inmunocomprometidos como adultos mayores y neonatos, en conjunto con la hospitalización prolongada y el uso de dispositivos médicos invasivos como el uso de agujas, ciertos implantes, catéteres intravenosos, prótesis, entre otros (Casey *et al.*, 2007).

2.4 Patogenicidad y factores de virulencia

Para poder causar una infección, los estafilococos cuentan con distintas estrategias y mecanismos propios de la especie y específicos de la cepa que les permite adherirse, invadir, persistir y evadir el sistema inmune del hospedador. Dentro de los factores de

virulencia con los que cuentan las distintas especies de los ECN incluyen la producción de moléculas como exotoxinas, bacteriocinas, hemolisinas, adhesinas, proteasas, distintos mecanismos de resistencia a antibióticos y sin duda la formación de la biopelícula (França *et al.*, 2021).

Debido a que colonizan la piel, cualquier daño sobre ésta constituye una vía de entrada. Una vez dentro, las bacterias esquivan la respuesta inmunológica debilitada y se inicia el proceso de colonización para la subsecuente infección. La inoculación puede darse al momento de insertar algún tipo de dispositivo médico que sobrepase la piel como catéteres, inoculando una pequeña cantidad de bacterias de la piel o mucosas del paciente. Seguido, la bacteria comienza el proceso de adhesión, el cual es el evento crítico para establecerse, multiplicarse y persistir (Becker *et al.*, 2014).

La adhesión de las bacterias a las células del hospedador o a las superficies de dispositivos médicos es el evento crítico para establecer la infección. La colonización de la superficie del dispositivo médico es debido a la capacidad que tiene la bacteria para formar biopelícula considerado como el factor de virulencia más importante en las infecciones asociadas a dispositivos médicos (Peters *et al.*, 1982; Schulin & Voss, 2001).

2.4.1 Características de la biopelícula

La biopelícula es un agregado de células bacterianas que se encuentran embebidas en una matriz extracelular polimérica, compuesta por productos secretados por la misma bacteria tales como carbohidratos, proteínas, ADN extracelular, lípidos, componentes del microambiente en el que se encuentra, así como una gran proporción de agua (Limoli *et al.*, 2015). La estructura de la biopelícula es amorfa y la matriz contiene canales en los cuales puede circular el agua para mantener el transporte de nutrientes, oxígeno, etc. Una vez establecida la biopelícula, las células inmersas en él están protegidas del medio ambiente que las rodea, lo cual las hace menos accesibles al sistema inmune del hospedero y terapias antimicrobianas. Por esta razón, se considera como uno de los factores de virulencia más importantes principalmente en el área hospitalaria, y su estudio facilita el desarrollo de nuevas estrategias para su control y erradicación (Percival *et al.*, 2015).

El proceso de formación de la biopelícula puede ser dividido en cuatro grandes pasos. El primero, involucra la adhesión de la célula bacteriana a la superficie del

dispositivo o a las células del hospedador. En el segundo, la bacteria empieza a aglomerarse o formar microcolonias y comienza la síntesis de la matriz. En el tercer paso, las microcolonias crecen y maduran formando la biopelícula. En esta fase la biopelícula cuenta con canales para el intercambio de nutrientes y oxígeno. En el cuarto paso, las células planctónicas o pequeños agregados de bacterias se desprenden y se diseminan a través del torrente sanguíneo repetir el proceso (Muhammad *et al.*, 2020).

Dentro de las especies de ECN existen diferencias entre la composición bioquímica y estructura de la biopelícula. La proporción de cada componente varía dependiendo de las condiciones ambientales y del mismo microorganismo. Estudios han determinado que los polisacáridos juegan un rol muy importante en la estructura de la biopelícula, especialmente una adhesina intracelular de polisacárido (PIA), la cual consiste en una cadena linear de residuos (~130) de poli-N-acetil-D-glucosamina (PNAG) unidos mediante enlaces β 1-6, involucrada en la formación de biopelícula de *S. aureus* y *S. epidermidis* (C. R. Arciola *et al.*, 2015). Fue identificada por primera vez en *S. epidermidis* y nombrada así por su rol en mediar las interacciones intracelulares para empezar la agregación celular formando microcolonias durante la formación de la biopelícula. Los genes involucrados con la biosíntesis de PNAG se encuentran dentro del operón *icaRADBC*, el cual contiene cuatro genes biosintéticos (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*) y un gen regulatorio (*icaR*) (H. Rohde *et al.*, 2007).

No solo los carbohidratos están presentes en la matriz extracelular, otro componente que se ha caracterizado como parte de la biopelícula es el ADN extracelular, proveniente de la lisis celular (Qin *et al.*, 2007). Se ha reportado que juega un rol de protección a la bacteria contra agentes químicos junto con otros componentes (Izano *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha reportado que existe muerte celular controlada que contribuye a la formación de la biopelícula (Bayles, 2007). Debido a su carácter polianiónico, el ADN tiene la capacidad de unirse a otras moléculas inmersas en la biopelícula como PNAG, por lo cual puede jugar un rol estructural o mantenimiento de la biopelícula (Pisetsky, 2017).

También se ha encontrado otros componentes en mayor o igual proporción que los polisacáridos en la biopelícula y aun así tener fuerte producción de ésta. Se ha reportado que la composición de la biopelícula producida por *S. lugdunensis* es diferente a lo

encontrado en *S. epidermidis* o *S. aureus*. Mediante microscopía confocal y ensayos enzimáticos se reportó la presencia de abundantes proteínas en la biopelícula de *S. lugdunensis*. A pesar de que se encontró un homólogo del locus *icaADBC* cuyos genes codifican productos que forman el PNAG, sin embargo, éste no fue el componente predominante (Frank & Patel, 2007; Missineo *et al.*, 2014). Estudios más recientes concuerdan con previos estudios y han reportado aislamientos con un mayor porcentaje de proteínas en la biopelícula, aunque también se han encontrado a aislamientos que tienen igual o menor proporción que los polisacáridos (Ravaioli *et al.*, 2020).

S. hominis se ha reportado como una bacteria productora de biopelícula, desde una biopelícula débil hasta biopelículas muy densas (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015; Soroush *et al.*, 2017; Szczuka *et al.*, 2018). La composición de la biopelícula en *S. hominis* aún no está del todo esclarecida, y los reportes sobre la formación de biopelícula y su composición es escasa y variante. Algunos reportes han demostrado que la composición es heterogénea entre carbohidratos, proteínas y ADN extracelular, además la composición varía entre los aislamientos. Mediante ensayos enzimáticos utilizando metaperyodato de sodio (NaIO_4) que rompe enlaces carbono-carbono, proteinasa K que corta enlaces proteicos y desoxirribonucleasa I (DNasa I) la cual corta enlaces entre moléculas de ADN, se ha estimado las proporciones de los componentes de la biopelícula en *S. hominis* mediante el desprendimiento de la biopelícula con estos sustratos.

A pesar de que se ha reportado la proporción de los componentes de la matriz extracelular, no se han encontrado estudios en esta bacteria sobre las características bioquímicas de los componentes. Aún falta información sobre qué tipos de proteínas y carbohidratos son los que forman parte de la matriz y su rol en la biopelícula, además de los genes implicados para su formación. Se ha visto que no solo los genes del locus *icaADBC* están implicados y que existen otras vías para su formación sin descubrir.

2.5 Resistencia a los antibióticos

Uno de los principales retos al tratar con infecciones relacionadas a ECN es la dificultad de tratamiento debido a la resistencia a los fármacos antimicrobianos. La resistencia a antibióticos está incrementando rápidamente en todo el mundo, limitando los fármacos eficaces para tratar las infecciones, debido a su uso indiscriminado (OMS,

2022). Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para contrarrestar los efectos de los antibióticos, son diversos y se incluye la limitación del contacto de la bacteria con el antibiótico, modificación del sitio blanco, inactivación del antibiótico y bombas de flujo, siendo mecanismos propios de la bacteria o adquiridos (Reygaert, 2018).

Fleming fue el descubridor de la penicilina en 1928 con lo que empezó la nueva era de los antibióticos. Fue el antibiótico más utilizado en la segunda guerra mundial y el antibiótico más utilizado para tratar infecciones por estafilococos. Sin embargo, poco después de su introducción se empezó a generar resistencia (Abraham & Chain, 1940).

En los años 1960 se introdujo la meticilina, una penicilina semisintética, para tratar a *S. aureus* resistente a penicilinas a nivel nosocomial. A pesar de ser efectivo en un principio, al poco tiempo fue detectada la resistencia en *S. aureus*, cepas denominadas *S. aureus* resistente a meticilina (Çetin & Ang, 1962). Pronto se reportó resistencia a meticilina dentro del grupo de los ECN, con una frecuencia de aislamientos meticilina resistentes que varía entre un 50% y hasta 85% (Diekema *et al.*, 2001; Rey *et al.*, 2022; V. Sharma *et al.*, 2010)

La resistencia a meticilina no solo se da para este antibiótico, también se ha relacionado con la resistencia a una gran parte de los antibióticos β -lactámicos, así como también se incrementa la resistencia a otras clases de antibióticos (Becker *et al.*, 2014). La resistencia a los antibióticos β -lactámicos está dada por dos mecanismos principales. El primero es por la producción de una enzima β -lactamasa la cual inactiva a la penicilina mediante la hidrólisis del anillo β -lactámico. El segundo es por la producción de una proteína de unión a penicilina alterada o modificada (PBP2a o PBP2') que impide la unión del antibiótico con la bacteria, esta proteína la codifica el gen *mecA* el cual forma parte de un elemento móvil genético denominado Cassette Cromosómico Estafilocócico *mec* o SCC*mec* (Reygaert, 2018).

En *S. hominis* se han detectado diferentes tipos de SCC*mec*, incluso se ha reportado un nuevo tipo. Además, diversas investigaciones han reportado aislamientos clínicos con la presencia de *mecA* y resistencia a meticilina con una frecuencia mayor a un 80% de los aislamientos analizados (Barbier *et al.*, 2010; Bouchami *et al.*, 2011; Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015).

Existen alternativas de tratamiento con distintos antibióticos para el tratamiento de infecciones por ECN, con distintos mecanismos de acción entre ellos, mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular como vancomicina, fosfomicina, imipenem, teicoplanina; inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos como trimetoprima, ciprofloxacina, levofloxacina y rifampicina; inhibidores de la síntesis de proteínas como clindamicina, eritromicina, linezolid, tetraciclina, tigeciclina y alteración de la membrana citoplasmática como daptomicina (França *et al.*, 2021). Se han reportado aislamientos de *S. hominis* resistentes a eritromicina (75%) y baja resistencia a clindamicina (16%) observando mayor resistencia a estos dos antibióticos, (93 y 77%, respectivamente) los aislamientos de *S. hominis* resistentes a meticilina. También, se ha reportado alta frecuencia mayor a un 70% de aislamientos de *S. hominis* provenientes de sangre resistentes a ampicilina, eritromicina y trimetoprima. Debido al incremento de la resistencia a la terapia antimicrobiana alternativa a penicilinas, las opciones terapéuticas son limitadas (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013; Szczuka *et al.*, 2016).

El antibiótico linezolid es miembro de las oxazolidinonas, el cual se utiliza como uno de los antibióticos de último recurso al tratar infecciones nosocomiales, incluyendo las causadas por estafilococos multifarmacorresistentes. Su mecanismo de acción es inhibiendo la síntesis de proteínas al inhibir la formación del complejo ribosomal. Es de las últimas opciones terapéuticas debido a su alta toxicidad, pero la resistencia a este antibiótico es escasa o nula. Existen algunos reportes de ECN con resistencia a linezolid, a pesar de esto, la resistencia a este antibiótico se ha mantenido estable desde su introducción en el 2000 con casos esporádicos de resistencia (Mittal *et al.*, 2019). En el caso de *S. hominis* existen pocos reportes sobre la resistencia a este antibiótico. Sin embargo, en los últimos 10 años se ha reportado con mayor frecuencia aislamientos con resistencia a este antibiótico tanto en *S. hominis* (Chamon *et al.*, 2014; L. M. de Almeida *et al.*, 2013; Ruiz de Gopegui *et al.*, 2011) como en otras especies de ECN (Gostev *et al.*, 2021; Kosecka-Strojek *et al.*, 2020). Se conocen dos mecanismos principales relacionados a la resistencia a linezolid en *Staphylococcus* spp., entre ellos la metilación del RNA ribosomal 23S mediada por una metiltransferasa que codifica el gen *cfr*, mutaciones en el RNA ribosomal y proteínas asociadas (Mittal *et al.*, 2019).

Otro de los antibióticos utilizados como último recurso es la vancomicina. Pertenece al grupo de los glicopéptidos y actúa inhibiendo la biosíntesis de la pared celular. Los mecanismos de resistencia de este antibiótico involucran distintas vías biosintéticas de la pared celular asociadas a un clúster de genes *van*, siendo el más reportado el estafilococos el gen *vanA* (Cong *et al.*, 2020). A pesar de ser ampliamente utilizado como uno de los antibióticos de último recurso para tratar infecciones asociadas a estafilococos resistentes a meticilina, la preocupación de adquirir resistencia a este antibiótico está latente. Los reportes de porcentajes de resistencia en *S. aureus* antes del 2010 se mantenían alrededor del 2% y después del 2010 ha aumentado hasta un 5.3% (Shariati *et al.*, 2020). La resistencia a este antibiótico en *S. hominis* es escasa, y son pocos los reportes encontrados sobre resistencia a vancomicina en esta bacteria (Aykut *et al.*, 2022). Aunque los aislamientos resistentes a estos antibióticos de último recurso son bajos, se debe de tener vigilancia al ser de los pocos fármacos antimicrobianos para lidiar contra una infección por estafilococos multifarmacorresistentes.

La rifampicina es otro antibiótico frecuentemente utilizado para tratar infecciones por estafilococos sobre todo en infecciones relacionadas a la formación de la biopelícula. Este antibiótico es de los pocos que se ha reportado ser eficaz contra la biopelícula por su alto nivel de difusión (Tang *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha asociado una rápida adquisición de la resistencia a este antibiótico cuando se utiliza como monoterapia, por lo cual se recomienda utilizarlo en combinación con vancomicina o levofloxacina (Zimmerli & Sendi, 2019).

2.6 Efecto de los antibióticos sobre la biopelícula

Existen distintos mecanismos utilizados por los microorganismos para contrarrestar los efectos de los antibióticos (Munita & Arias, 2016). A pesar de que la forma más común de adquirir resistencia antimicrobiana es de naturaleza genética, se ha asociado un incremento en la farmacorresistencia en aislamientos productores de biopelícula (S. Singh *et al.*, 2017). Tradicionalmente, los ensayos de susceptibilidad a antibióticos se han realizado midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las células planctónicas, la cual comúnmente es un valor bajo para administrar la terapia antimicrobiana. Sin embargo, para tratar las infecciones causadas por bacterias

productores de biopelícula, la concentración requerida es muy alta. En estos casos el tratamiento no suele ser efectivo y sobrepasa la dosis segura que se le puede administrar al paciente. Se ha reportado que este incremento en la resistencia puede aumentar de 100 hasta 1,000 veces en gran variedad de antibióticos y distintas bacterias (D. Sharma *et al.*, 2019).

La biopelícula, por su naturaleza, tiene características arquitectónicas y estructurales únicas tales como canales internos, macro y micro colonias. Los canales ayudan a la difusión de nutrientes, intercambio gaseoso y al paso de agentes químicos como antibióticos. En respuesta al medio ambiente, las bacterias son capaces de modular la arquitectura de la biopelícula para contrarrestar las condiciones adversas y asegurar su supervivencia (S. Singh *et al.*, 2017). Existen reportes que confirman que las células planctónicas y las células desprendidas de la biopelícula tienen perfiles de susceptibilidad similares, mientras que las células inmersas en la biopelícula muestran alta resistencia (Kirby *et al.*, 2012). Se ha relacionado la resistencia antimicrobiana con las características estructurales de la biopelícula que en primera instancia limita la difusión del antibiótico por lo cual éste se encontrará en concentraciones subinhibitorias (Lebeaux *et al.*, 2014). En un principio se pensaba que los antibióticos en la naturaleza, aunque se encontraran en bajas dosis, eran efectivos contra otros microorganismos. Por lo cual, se pensaba que concentraciones subinhibitorias reducían la virulencia, aunque no fueran capaces de matar al microorganismo (Haddadin *et al.*, 2010). Este panorama cambió al estudiar el efecto *in vitro* de concentraciones subinhibitorias sobre células planctónicas y dentro de la biopelícula. Estos estudios mostraron que antibióticos en bajas dosis no mataban o inhibían el crecimiento de la bacteria, pero sí la afectaban en procesos fisiológicos, incluso a nivel genético. El efecto del antibiótico sobre la bacteria depende de las características de ésta observando variaciones entre el género, la especie, subespecie y aislamiento. Además, depende del tipo de antibiótico y la concentración a la que sea expuesta la bacteria, el efecto puede ser negativo, positivo o neutro (Zhanel *et al.*, 1992).

En la Tabla 1 se resumen algunas de las investigaciones realizadas acerca del efecto de diferentes concentraciones subinhibitorias sobre la biopelícula en distintas especies de estafilococos (Stoitsova, 2016).

Tabla 1. Efecto de concentraciones subinhibitorias de distintas clases de antibióticos sobre la biopelícula en *Staphylococcus* spp.

Clase	Antibiótico	Concentración	Bacteria	Efecto sobre la biopelícula
Penicilinas	Meticilina	1/3–1/8 CMI	<i>S. aureus</i> (n=1)	Biopelícula más densa y variantes de colonias pequeñas
	Nafcilina	0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=15)	Incremento de la biopelícula
		1/3–1/8 CMI	<i>S. aureus</i> (n=1)	Sin efecto
	Dicloxacilina	1/2 CMI	<i>S. epidermidis</i> (n=3)	Inhibición en un 30-60%
		8 µg/ml	<i>S. epidermidis</i> (n=1) <i>S. haemolyticus</i> (n=1)	Reducción de la biomasa de la biopelícula y de la síntesis de EPS y PNAG
Ampicilina	0.1–1.1 µg/ml	<i>S. saprophyticus</i> (n=1)	Estimulación de la formación de biopelícula sub-CMI	
Cefalosporinas	Cefazolina	1/2 CMI	<i>S. epidermidis</i> (n=3)	Inhibición de un 30-55%
		0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=15)	Incremento (13%), sin efecto (80%) y decremento (7%)
	Cefalotina	1/3–1/8 CMI	<i>S. aureus</i> (n=1)	Biopelícula más densa (3–4x) y variantes de colonias pequeñas
	Cefoperazona	1/3–1/8 CMI	<i>S. aureus</i> (n=1)	Sin efecto
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	0.1–1.1 µg/ml	<i>S. saprophyticus</i> (n=1)	Estimulación de la formación de biopelícula
		1/2–1/8 CMI	<i>S. epidermidis</i> (n=20)	Reducción el crecimiento de la biopelícula
	Levofloxacino	0.06–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=15)	Incremento (20%), sin efecto (47%) y decremento (40%)
	Moxifloxacino	2–100 CMI	<i>S. aureus</i> (n=1) y ECN (n=6)	Sin efecto
Macrólidos	Azitromicina	2.5–10 mg/ml	<i>S. aureus</i> (n=8)	Reducción de la biopelícula
		0.25 CMI	<i>S. epidermidis</i> (n=96)	Incremento (21%), sin efecto (75%) y decremento (4%)
Aminoglucósidos	Gentamicina	sub-100 CMI	<i>S. aureus</i> (n=2)	Incremento de la biopelícula
Estreptograminas	Quinupristina-dalfopristina	0.5 µg/ml	<i>S. epidermidis</i> (n=2)	Aumento en la expresión de <i>icaADBC</i> y la síntesis de EPS
		0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=1)	Incremento (20%), sin efecto (47%) y decremento (33%)
Glucopéptidos	Vancomicina	1/2 CMI	<i>S. epidermidis</i> (n=3)	Inhibición de la biopelícula en 8–24%
		0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=1)	Incremento (27%), sin efecto (47%) y decremento (27%)
		0.5 CMI	<i>S. epidermidis</i> (n=2)	Disminución de la biopelícula
Tetracilinas	Tetracilina	0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=15)	Incremento (7%), decremento (93%)
		0.5 µg/ml	<i>S. epidermidis</i> (n=2)	Mejora de la expresión de <i>icaADBC</i> y la síntesis de EPS
Inhibidores de la dihidrofolato reductasa	Trimetoprima-sulfametoxazol	0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=15)	Incremento (20%), sin efecto (40%) y decremento (40%)
Oxazolidononas	Linezolid	0.0625–0.5 CMI	<i>S. lugdunensis</i> (n=15)	En el 80% sin efecto, en el 20% se disminuyó

Fuente: Modificado de Stoitsova *et al.* (2016). Sub-CMI: concentración subinhibitoria, PNAG: Poli-N-acetil-D-glucosamina, EPS: Matriz extracelular

3. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus hominis es la tercera especie más frecuentemente aislada dentro del grupo de estafilococos coagulasa negativos a partir de especímenes clínicos y es el agente causal de diversos tipos de infecciones intrahospitalarias, principalmente bacteriemias.

Su capacidad de formar biopelícula protege a la bacteria y puede aumentar la farmacorresistencia. Debido a la difusión limitada de compuestos a través de la biopelícula, es común que las bacterias estén expuestas a concentraciones subinhibitorias de antibióticos que pueden afectar a las células bacterianas, pero no son capaces de eliminarlas.

En *S. hominis* no se ha esclarecido por completo la composición de la biopelícula, así como los genes asociados a su formación y farmacorresistencia. Además, no se conoce el efecto que tienen las concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre estos parámetros.

4. HIPÓTESIS

La composición y formación de la biopelícula de los aislamientos clínicos de *S. hominis* se ve afectada por concentraciones subinhibitorias de antibióticos aumentando la virulencia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar los componentes de la biopelícula de *S. hominis* y el efecto que tienen concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre su estructura, composición, y la presencia de genes asociada a su formación y farmacorresistencia.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar a nivel subespecie los aislamientos clínicos de *S. hominis*.
2. Determinar el nivel de producción de la biopelícula.
3. Obtener el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células platónicas y de la biopelícula y determinar las concentraciones subinhibitorias respectivas (CMI y CMEB).
4. Determinar la composición y el nivel de producción la biopelícula con y sin subCMI y subCMEB.
5. Determinar la presencia de los genes involucrados en la formación de la biopelícula y en la resistencia a los antibióticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamientos clínicos

Se incluyeron 90 aislamientos clínicos de *S. hominis* provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL y del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” entre los años 2017 y 2018 provenientes de sangre y líquido cefalorraquídeo. Cada aislamiento se reactivó metabólicamente en agar soya tripticasa (AST) (Becton Dickinson Diagnostic, Estados Unidos) suplementado con 5% de sangre a 35 °C durante 24 h. Se verificó la pureza del cultivo y los aislamientos se conservaron en tubos crioviales de 2 mL con caldo soya tripticasa (CST) (Becton Dickinson Diagnostic, Estados Unidos) adicionado con 15% de glicerol. Los aislamientos se conservaron en ultracongelación a –80 °C hasta su uso.

6.2 Identificación

Se realizó la confirmación de la identificación mediante la espectrometría de masas a través de la desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo MALDI-TOF MS de acuerdo con la metodología descrita por el fabricante (Microflex LT system, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Con un aplicador de madera de cada aislamiento se transfirieron de 1–2 colonias de un cultivo joven de 24 h a un pocillo de la placa del equipo de 96 pocillos de acero inoxidable. Seguido, se le añadió 1 µl de ácido fórmico al 70% para facilitar la extracción proteica y se dejó secar completamente. Posteriormente, se adicionó 1 µl de la matriz ácido 4-bromo- α -cianocinámico, Sigma-Aldrich, Toluca, México) y de igual manera se dejó secar por completo. Después, la placa se introdujo en el equipo controlado 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 en cuenta como una identificación confiable de género y especie un score ≥ 2.0 . Los aislamientos con 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. Todos los aislamientos con un score < 2.0 se volvieron a introducir en el equipo para confirmar su clasificación.

6.2.1 Determinación de la subespecie

Para diferenciar entre las subespecies de *S. hominis*, a partir de un cultivo puro de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland equivalente a 0.08–0.13 de absorbancia a 625 nm. Posteriormente, con un aplicador estéril de 15 cm con punta de algodón se inoculó sobre toda la superficie de una placa con agar Müller-Hinton (Becton Dickinson Diagnostic, NJ, Estados Unidos) y se dejó reposar durante 5 min. Seguido a esto, se colocó el disco de novobiocina (Sigma-Aldrich, BA, Estados Unidos) de 5 µg con la ayuda de pinzas estériles en el centro de la superficie del agar previamente inoculado y presionando ligeramente para asegurar el contacto del disco con el medio. La placa se incubó a 35 °C durante 24 h. Después de la incubación, se determinó el tamaño en mm de la zona de inhibición alrededor del disco de novobiocina. Se consideró susceptible con un halo de inhibición ≥ 17 mm y resistente ≤ 16 mm. Aquellos aislamientos con resistencia a novobiocina se clasificaron como *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (SHN) y los susceptibles como *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH) (Wesley E. Kloos, 1998).

6.3 Detección de genes asociados a la resistencia a antibióticos y formación de biopelícula

6.3.1 Extracción de ADN

El ADN genómico se realizó mediante la técnica de fenol cloroformo con algunas modificaciones. A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h, se suspendieron de 5–8 colonias en un microtubo de poliestireno conteniendo 200 µL de Tris-HCl 100 mM (Invitrogen, Thermo Fisher, Estados Unidos) a pH:8 estéril. Los tubos se sometieron a 92 °C en un bloque de calentamiento durante 25 min. Posteriormente, se añadieron 150 µL de lisozima (Sigma Aldrich, Estados Unidos) a cada microtubo y se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, se añadieron 200 µL de buffer TE 1X con SDS al 1% y 3 µL de proteinasa K (Sigma Aldrich, Estados Unidos) en solución a 20 mg/mL y se incubaron a 55°C en un baño de agua durante 2 h. Seguido, se añadieron 250 µL de fenol saturado homogenizando cinco veces por inversión, 250 µL cloroformo con alcohol isoamílico 24:1 homogenizando cinco veces por inversión y 100 µL de buffer TE 1X homogenizando 5 min por inversión. Después, los microtubos se

centrifugaron a 14000 r.p.m por 8 min y se transfirieron 300 μ L de la fase acuosa a otro microtubo con cuidado de no tocar ni aspirar la interfase blanca y se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto a cada microtubo que contenía la fase acuosa y se mantuvieron a -20°C durante 1 h. A continuación, los microtubos se centrifugaron 5 min a 14,000 r.p.m, se descartó el sobrenadante y añadió 1 ml de etanol al 70%. Este procedimiento se realizó dos veces. Seguido, los tubos se dejaron destapados cubiertos por papel secante durante 24 h a temperatura ambiente para dejar secar la pastilla de ADN. Pasadas las 24 h, la pastilla se suspendió en 100 μ L de buffer TE 1X y se calentó en un baño de agua a 65°C durante 15 min. Se verificó la correcta extracción corriendo 3 μ L de ADN con 1 μ L de buffer de carga y 1 μ L del revelador GelRed (Biotium, CA, Estados Unidos) en un gel de agarosa al 1.5% sumergido en buffer TBE 0.5 X en una cámara de electroforesis (Mini-Sub cell GT, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, Estados Unidos) a 110V durante 20 min. El gel se reveló en un transiluminador de luz UV (UVIDOC HD6 Gel documentation system, Cleaver Scientific Ltd, Reino Unido) para verificar la presencia del ADN. Los microtubos se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

6.3.2 Genes asociados a formación de la biopelícula

Se investigó la presencia de los genes *icaA* e *icaD* que codifican la enzima N-acetilglucosamil transferasa encargada de sintetizar la adhesina intracelular de polisacárido (PIA) asociada a la formación de biopelícula pertenecientes al locus *icaABCD* mediante una PCR múltiple de punto final (Carla Renata Arciola *et al.*, 2005). A partir de un cultivo joven de 24 h a 37°C , se realizó la extracción de ADN de cada aislamiento mediante la técnica de fenol-cloroformo. Se realizó la mezcla de reacción en un microtubo de poliestireno incluyendo 14.5 μ L de agua ultrapura grado molecular, 0.35 μ L de cada iniciador (Tabla 2) a una concentración 50 μ M, 0.5 μ L de mix dNTPs a 400 μ M, 2.5 μ L buffer de reacción a 10X, 1.5 μ L de MgCl_2 a 2.5 mM, 1 μ L Taq ADN polimerasa (MyTaq, Meridian Bioscience, Estados Unidos) a 0.5 U y 1 μ L de ADN obteniendo un volumen final de 25 μ L. Se llevó a cabo la PCR con las siguientes condiciones: para la desnaturalización inicial un ciclo a 94°C por 5 min, seguido de 50 ciclos de desnaturalización 94°C por 30 s, alineamiento 54°C por 30 s, elongación 72°C por 1 min, y para la extensión final, un ciclo a 72°C por 2 min. Los productos se revelaron

mediante una electroforesis convencional con 3 μL del producto de PCR, 1 μL de buffer de carga y 1 μL del revelador GelRed en un gel de agarosa al 1.5% sumergido en buffer TBE 0.5 X a 110V durante 20 min. El gel se reveló en un transiluminador de luz UV para verificar la presencia del ADN. Se utilizó el marcador de peso molecular HyperLadder 100 pb (Bioline, Meridian Bioscience, Estados Unidos) para verificar el tamaño del producto. Se utilizó un control interno de *S. epidermidis* ID12701 como control positivo del producto de PCR.

Tabla 2. Iniciadores de los genes relacionados a la formación de la biopelícula

Gen	Secuencia del iniciador	Tamaño (pb)
<i>icaA</i>	Forward 5'- ACAGTCGCTACGAAAAGAAA -3'	103
	Reverse 5'- GGAAATGCCATAATGACAAC -3'	
<i>icaD</i>	Forward 5'- ATGGTCAAGCCCAGACAGAG -3'	397
	Reverse 5'- CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA -3'	

6.3.3 Detección de genes asociados a la resistencia a antibióticos

Se investigó la presencia de los genes asociados a la resistencia a meticilina mediante la detección del gen *mecA* que codifica una variante de la proteína de unión a penicilina (PBP2a o PBP2', por sus siglas en inglés) y la resistencia a linezolid mediante la detección del gen *cfr* que codifica una metiltransferasa que modifica la estructura de la subunidad 23s del ribosoma.

Para la detección del gen *mecA* se realizó una mezcla de reacción 17.05 μL de agua ultrapura grado molecular, 0.35 μL de cada iniciador forward y reverse (Tabla 3) a una concentración 50 μM , 0.5 μL de mix dNTPs a 400 μM , 2.5 μL buffer de reacción a 10X, 1.75 μL de MgCl_2 a 2.5 mM, 1.5 μL Taq ADN polimerasa a 0.5 U y 1 μL de ADN obteniendo un volumen final de 25 μL . La PCR se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015): 1 ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C y 2 min a 72 °C, y por último un ciclo por 10 min a 72 °C. Como control positivo se utilizó un control interno *S. hominis* ID397.

Para la detección del gen *cfr* se realizó la mezcla de reacción 16.5 μL de agua ultrapura grado molecular, 0.5 μL de cada iniciador forward y reverse (Tabla 3) a una concentración 50 μM , 0.5 μL de mix dNTPs a 400 μM , 2.5 μL buffer de reacción a 10X, 1.5 μL de MgCl_2 a 2.5 mM, 2 μL Taq ADN polimerasa a 0.5 U y 1 μL de ADN obteniendo un volumen final de 25 μL . La PCR se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones

(C. Kehrenberg & Schwarz, 2006): 1 ciclo de 1 min a 94 °C, seguido de 34 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 48°C y 3 min a 72 °C, y por último un ciclo por 7 min a 72 °C. Se utilizó un control interno de *S. epidermidis* ID14565 como control positivo del producto de PCR.

Los productos de PCR de ambos genes se revelaron mediante una electroforesis convencional con 3 µL del producto de PCR, 1 µL de buffer de carga y 1 µL del revelador GelRed en un gel de agarosa al 1.5% sumergido en buffer TBE 0.5 X a 110V durante 20 minutos. El gel se reveló en un transiluminador de luz UV para verificar la presencia del producto amplificado. Se utilizó el marcador de peso molecular HyperLadder 100 pb para verificar el tamaño del producto.

Tabla 3. Iniciadores de los genes asociados a la resistencia a antibióticos.

Gen	Secuencia del iniciador	Tamaño (pb)
<i>mecA</i>	Forward 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT -3'	147
	Reverse 5'- ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT- 3'	
<i>cfr</i>	Forward 5'TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA-3'	746
	Reverse 5'- ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC-3'	

6.4 Nivel de producción de biopelícula

Se determinó mediante la tinción con cristal violeta siguiendo la metodología propuesta por Christensen con modificaciones menores (Christensen *et al.*, 1985). A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en CST suplementado con 1% glucosa (CST_{glu1%}). De esta dilución se transfirieron 200 µL a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Corning Costar, NY, Estados Unidos). Se realizaron 4 repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control negativo con medio sin inocular. La placa se incubó a 35 °C durante 24 h. Se utilizaron cepas control de *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo de formación de la biopelícula y *S. hominis* ATCC 27844 como control negativo.

Para determinar la densidad óptica (DO) de la biopelícula se eliminaron las células planctónicas descartando el sobrenadante y realizando tres lavados con 200 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Posteriormente, se realizó la fijación de la biopelícula adicionando 200 µL de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar

durante 15 min, se descartó el metanol y se dejó secar por completo. Una vez secos, se añadió 200 µL de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos y se dejó incubar 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron de 5 a 8 lavados con 200 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Posteriormente, se le agregó a cada pocillo 200 µL de una mezcla de etanol-acetona a razón 7:3 y se dejó actuar al menos 20 min a temperatura ambiente con la finalidad de disolver el cristal violeta adherido a la biopelícula. Por último, se realizó la lectura de la densidad óptica en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, Estados Unidos) a 595 nm. El criterio de evaluación se llevó a cabo mediante los siguientes rangos de clasificación de acuerdo con la DO obtenida. Un valor de $DO \leq 0.12$ se clasificaron como no productor, en el rango 0.120 a 0.24 como productor débil, y $DO \geq 0.24$ como productor fuerte.

6.5 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos

6.5.1 Preparación de los antibióticos

Se incluyeron siete antibióticos con significancia clínica utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por ECN. Los antibióticos seleccionados fueron linezolid (LZD), trimetoprima (TMP), vancomicina (VAN), levofloxacina (LEV), oxacilina (OXA), daptomicina (DAP). y rifampicina (RIF) (Sigma-Aldrich, BA, Estados Unidos). Se prepararon las soluciones stock de cada antibiótico a una concentración de 1,024 µg/mL a partir del antibiótico en polvo. Se tomó en cuenta la potencia de cada antibiótico que especifica el fabricante y se utilizó el disolvente recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) en el documento M100 para cada uno (CLSI, 2022). Las soluciones stock se esterilizaron con un filtro de 0.22 µm desechable estéril (Corning Inc, NY, Estados Unidos). Las soluciones se conservaron en ultracongelación a -80 °C. Se utilizó la cepa control de *S. aureus* ATCC 29213 como control de calidad de las soluciones stock preparadas.

6.5.2 Susceptibilidad en células planctónicas

Se llevó a cabo mediante el método de micro dilución descrito por el CLSI, en el documento M07-A10 y M-100 para los antibióticos a ensayar (CLSI, 2018, 2022). A partir

de un cultivo puro de 24 h en agar sangre (Becton Dickinson Diagnostic, NJ, Estados Unidos) 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% ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. A partir del inóculo, éste se diluyó a razón 1:150 en caldo Müller-Hinton para LZD, TMP, LEV, VAN y RIF, caldo Müller-Hinton suplementado con 50 µg/mL de Ca⁺² para DAP y caldo Müller-Hinton suplementado con 2% NaCl para OXA. Seguido a esto, se tomaron 100 µL y se transfirieron a cada pocillo del panel de antibióticos que contenía 100 µL de diluciones seriadas de los antibióticos a probar. En cada placa se dejó un pocillo sin inocular como control negativo y un pocillo para cada aislamiento con la bacteria sin el antibiótico como control positivo. Las placas se incubaron a 35 °C por 16–18 h para LZD, TMP, LEV, DAP y RIF y 24 h para OXA y VAN, tratando de no apilar más de 4 cajas, para evitar diferencia en la temperatura. Posterior a la incubación, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración de antibiótico en la cual no se aprecia crecimiento a simple vista. Se consideró como concentración subinhibitoria cuatro diluciones por debajo de la CMI (subCMI) interpretadas como 1/2 a 1/64.

6.5.3 Susceptibilidad en células de la biopelícula

6.5.3.1 Dispositivo Calgary

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se realizó la preparación de los inóculos de cada aislamiento productor de biopelícula por suspensión de 3–5 colonias en tubos con solución salina estéril al 0.85% ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. El inóculo se diluyó a razón 1:50 en CST_{glu1%}. Seguido, se transfirieron 150 µL 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. La placa se incubó a 35 °C por 24 h en agitación a 150 r.p.m. Posterior a la incubación, las clavijas se enjuagaron dos veces por inmersión en una microplaca de 96 pocillos con 200 µL de PBS 1X pH:7.2 estéril para eliminar la mayor parte de las células no adheridas. La tapa se transfirió al panel de antibióticos y se incubaron las placas a 35 °C por 24 h. Posteriormente, se retiró a la tapa del panel de antibióticos y se enjuagaron las clavijas dos veces y se transfirió la tapa a una microplaca

conteniendo 200 µL en cada pocillo caldo Müller-Hinton, la cual se dejó reposar durante 30 minutos y se sonicó 5 min en un baño ultrasónico a 40 KHz (Branson 5800, Danbury, Estados Unidos). Después, se retiró la tapa con las clavijas y se cambió a una tapa normal. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Posterior a la incubación, se determinó la concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB) como la concentración mínima de antibiótico que a simple vista no presenta crecimiento y erradica la biopelícula. La concentración subinhibitoria de erradicación de la biopelícula (subCMEB) se tomó en el rango de $1/2$ a $1/64$ a partir de la CMEB.

6.5.3.2 Fondo plano

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en CST_{glu1%}. De esta dilución se transfirieron 200 µL a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Corning Inc, NY, Estados Unidos) para formar la biopelícula. Después, se retiró el sobrenadante con las células planctónicas y se realizaron tres lavados con 200 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril. Posteriormente, se añadieron 200 µL de soluciones seriadas de los antibióticos y se incubaron las placas durante 24 h. Después del tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante con los antibióticos y se realizaron tres lavados con 200 µL de buffer PBS 1X. Seguido, a cada pocillo se añadieron 200 µL de CST nuevo y se incubaron las placas durante 24 h a 35 °C. Por último, se determinó la CMEB.

6.6 Nivel de producción de biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos.

6.6.1 Células planctónicas

Se determinó mediante la tinción con cristal violeta siguiendo la metodología propuesta por Christensen con modificaciones menores (Christensen *et al.*, 1985) y añadiendo concentraciones subinhibitorias de los antibióticos tomando en cuenta la CMI de células planctónicas (subCMI) en el rango de $1/2$ a $1/64$.

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una

dilución 1:50 en CST_{glu1%}. De esta dilución se transfirieron 100 µL a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Corning Costar, NY, Estados Unidos) conteniendo 100 µL de las diluciones seriadas de subCMI de los antibióticos. La placa se incubó a 35 °C durante 24 h. Después, se eliminaron las células planctónicas descartando el sobrenadante y se hicieron tres lavados con 200 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Posteriormente, se realizó la fijación de la biopelícula adicionando 200 µL de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, se descartó el metanol y se dejó secar por completo. Una vez secos, se añadió 200 µL de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos y se dejó incubar 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron de 5 a 8 lavados con 200 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Posteriormente, se le agregó a cada pocillo 200 µL de una mezcla de etanol-acetona a razón 7:3 y se dejó actuar al menos 20 min a temperatura ambiente. Por último, se realizó la lectura de la DO en el lector de microplacas a 595 nm. El criterio de evaluación se llevó a cabo mediante lo estipulado previamente: no productor, productor débil, y productor fuerte.

6.6.2 Células de la biopelícula

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en CST_{glu1%}. De esta dilución se transfirieron 200 µL a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano para formar la biopelícula. Después, se retiró el sobrenadante con las células planctónicas y se realizaron tres lavados con 200 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril. Posteriormente, se añadieron 200 µL de soluciones seriadas de los antibióticos y se incubaron las placas durante 24 h. Después del tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante con los antibióticos y se realizaron tres lavados con 200 µL de buffer PBS 1X. Posteriormente, se realizó la fijación de la biopelícula adicionando 200 µL de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, se descartó el metanol y se dejó secar por completo. Una vez secos, se añadió 200 µL de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos y se dejó incubar 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron de 5 a 8

lavados con 200 μL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Posteriormente, se le agregó a cada pocillo 200 μL de una mezcla de etanol-acetona a razón 7:3 y se dejó actuar al menos 20 min a temperatura ambiente. Por último, se realizó la lectura de la DO en el lector de microplacas a 595 nm. El criterio de evaluación se llevó a cabo mediante lo estipulado previamente: no productor, productor débil, y productor fuerte.

6.7 Composición de la biopelícula por ensayos de desprendimiento

Se realizaron ensayos de composición de biopelícula por desprendimiento de cada componente sin y con concentraciones subinhibitorias de antibióticos (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015) utilizando la subCMI y subCMEB.

6.7.1 Sin antibiótico

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en $\text{CST}_{\text{glu}1\%}$. De esta dilución se transfirieron 200 μL y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada aislamiento (control, carbohidratos, proteínas y ADN). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Se descartó el sobrenadante y se eliminó el exceso de líquido y se realizaron tres lavados con 200 μL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Una vez secos se le añadió a cada pocillo 200 μL del sustrato correspondiente: a) 40 mM de NaIO_4 (Sigma-Aldrich) en agua bidestilada, b) 0.1 mg/ml de proteinasa K (Bioline, Londres, Reino Unido) en 20 mM Tris-HCl a pH 7.5 con 100 mM NaCl, y c) 0.5 mg/ml DNasa I (Sigma-Aldrich) en 5 mM MgCl_2 . Se dejó una placa control sin la adición de sustrato, así como un pocillo como control de esterilidad y como blanco espectrofotométrico, y las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Transcurridas las 24 h, se descartaron los sustratos de cada placa y se realizaron tres lavados con 200 μL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril a cada placa. Posteriormente, se realizó la fijación de la biopelícula adicionando 200 μL de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, se descartó el metanol y se dejó secar por completo. Después, se le añadieron 200 μL de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos de las cuatro placas

y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron cinco lavados con buffer PBS 1X, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 μ L de una mezcla de etanol-acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la DO en el lector de microplacas a 595 nm. El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control. El criterio de evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera: <10% sin desprendimiento, de 10 a 50% desprendimiento intermedio, de 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y >75% desprendimiento fuerte.

6.7.2 Con antibióticos

6.7.2.1 SubCMI

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:50 en CST_{glu1%}. De esta dilución se transfirió 100 μ L a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos conteniendo 100 μ L de las diluciones seriadas de subCMI de los antibióticos. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada aislamiento (control, carbohidratos, proteínas y ADN). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Se descartó el sobrenadante y se eliminó el exceso de líquido y se realizaron tres lavados con 200 μ L de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar por completo. Una vez secos se le añadió a cada pocillo 200 μ L del sustrato correspondiente: a) 40 mM de NaIO₄ en agua bidestilada, b) 0.1 mg/ml de proteinasa K en 20 mM Tris-HCl a pH 7.5 con 100 mM NaCl y c) 0.5 mg/ml DNasa I en 5 mM MgCl₂. Se dejó una placa control sin la adición de sustrato, así como un pocillo como control de esterilidad y como blanco espectrofotométrico, y las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Transcurridas las 24 h, se descartaron los sustratos de cada placa y se realizaron tres lavados con 200 μ L de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril a cada placa. 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, se descartó el metanol y se dejó secar por completo. Después, se le añadieron 200 μ L de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos de las cuatro placas y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo,

se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron cinco lavados con buffer PBS 1X, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 μ L de una mezcla de etanol-acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la DO en el lector de microplacas a 595 nm. El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control, como se estipuló previamente.

6.7.2.2 SubCMEB

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en CST_{glu}1%. De esta dilución se transfirió 200 μ L a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada aislamiento (control, carbohidratos, proteínas y ADN). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 200 μ L de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril. Seguido, se añadieron 200 μ L de las diluciones seriadas de los antibióticos subCMEB y se incubaron las placas durante 24 horas a 35°C. Al terminar la incubación, se realizaron tres lavados con 200 μ L de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril, una vez secas, se le añadió a cada pocillo 200 μ L del sustrato correspondiente: a) 40 mM de NaIO₄ en agua bidestilada, b) 0.1 mg/ml de proteinasa K en 20 mM Tris-HCl a pH 7.5 con 100 mM NaCl, y c) 0.5 mg/ml DNasa I en 5 mM MgCl₂. Se dejó una placa control sin la adición de sustrato, así como un pocillo como control de esterilidad y como blanco espectrofotométrico, y las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Transcurridas las 24 h, se descartaron los sustratos de cada placa y se realizaron tres lavados con 200 μ L de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril a cada placa. 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, se descartó el metanol y se dejó secar por completo. Después, se le añadieron 200 μ L de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos de las cuatro placas y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron cinco lavados con buffer PBS 1X, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 μ L de una mezcla de etanol-acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura

ambiente. Se realizó la lectura de la DO en el lector de microplaca 595 nm. El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control, como se estipuló previamente.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Estados Unidos) comparando las medias de la DO de cada componente con subCMI y subCMEB contra el control sin antibiótico mediante un ANOVA de dos factores con post hoc de Dunnet.

6.8 Visualización de la estructura de la biopelícula

Se visualizó la estructura de la biopelícula sin y con concentraciones subinhibitorias subCMI y subCMEB mediante microscopía de fluorescencia (Panda & Singh, 2018) con algunas modificaciones.

6.8.1 Sin antibióticos

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en CST_{glu1%}. Una vez ajustado el inóculo, se transfirió 300 µL de la dilución en un pocillo de la cámara de vidrio para cultivo celular de 8 pozos (Lab-Tek, Thermo Scientific, Estados Unidos) y se dejó incubar a 35 °C durante 24 h. Posteriormente, el medio se descartó y se lavó tres veces con 400 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril. Seguido, la biopelícula se fijó con 300 µL de metanol-acetona 1:1 a -20 °C y se dejó incubar en refrigeración por 15 min. Transcurrido el tiempo de fijación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por completo. Posteriormente, a cada pocillo se añadieron 100 µL de los siguientes fluoróforos: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) para visualización de ácidos nucleicos; aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con Alexa flúor 488 para visualizar carbohidratos (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y FilmTracer SYPRO Ruby (Invitrogen) para visualizar proteínas, a una concentración final 1 µg/ml, 20 µg/ml y 0.4X, respectivamente. El marcaje de la biopelícula se llevó a cabo en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. Seguido, cada pocillo se enjuagó tres veces con 400 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar. Por último, la laminilla se visualizó en un microscopio de fluorescencia (Eclipse 300i, Nikon, Estados Unidos) en

el objetivo 20X a 341 nm de excitación y 452 de emisión para DAPI, 495 nm de excitación y 519 de emisión para WGA-Alexa flúor 488 y 450 nm de excitación y 610 nm de emisión para FilmTracer SYPRO Ruby. Las imágenes se capturaron con el software QCapture Pro7.0 (QImaging, Teledyne photometrics, Estados Unidos) y se realizaron los análisis morfométricos mediante el software ImageJ 1.52 (National Institutes of Health, Estados Unidos).

6.8.2 Con antibióticos

6.8.2.1 SubCMI

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:50 en CST_{glu1}%. Una vez ajustado el inóculo, se transfirió 150 µL de la dilución en un pocillo de la cámara conteniendo 150 µL de diluciones seriadas subCMI de cada antibiótico. Las cámaras se incubaron a 35 °C durante 24 h. Posteriormente, el medio se descartó y se lavó tres veces con 400 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril. Seguido, la biopelícula se fijó con 300 µL de metanol-acetona 1:1 a -20 °C y se dejó incubar en refrigeración por 15 min. Transcurrido el tiempo de fijación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por completo. Posteriormente, a cada pocillo se añadieron 100 µL de los siguientes fluoróforos: DAPI para visualización de ácidos nucleicos, WGA conjugada con Alexa flúor 488 para visualizar carbohidratos y FilmTracer SYPRO Ruby para visualizar proteínas, a una concentración final 1 µg/ml, 20 µg/ml y 0.4X, respectivamente. El marcaje de la biopelícula se llevó a cabo en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. Seguido, cada pocillo se enjuagó tres veces con 400 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar. Por último, la laminilla se visualizó en un microscopio de fluorescencia en el objetivo 20X a 341 nm de excitación y 452 de emisión para DAPI, 495 nm de excitación y 519 de emisión para WGA-Alexa flúor 488 y 450 nm de excitación y 610 nm de emisión para FilmTracer SYPRO Ruby. Las imágenes se capturaron con el software QCapture Pro7.0 y se realizaron los análisis morfométricos mediante el software ImageJ 1.52. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 6.0 comparando las medias de la densidad integrada de cada componente con subCMI contra el control sin antibiótico mediante un ANOVA de dos factores con post hoc de Dunnet.

6.8.2.2 SubCMEB

A partir de un cultivo puro en agar sangre de 24 h se ajustó el inóculo en solución salina al 0.85% estéril a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:100 en CST_{glu1%}. Una vez ajustado el inóculo, se transfirió 300 µL de la dilución en un pocillo de la cámara de vidrio para cultivo celular de 8 pozos y se dejó incubar a 35 °C durante 24 h. Posteriormente, el medio se descartó y se lavó tres veces con 400 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril. Seguido, se añadieron 300 µL de las diluciones seriadas de los antibióticos subCMEB y se incubaron las cámaras durante 24 horas a 35°C. Después de la incubación, se añadieron 300 µL de metanol-acetona 1:1 a -20 °C y se dejó fijar la biopelícula en refrigeración por 15 min. Transcurrido el tiempo de fijación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por completo. Posteriormente, a cada pocillo se añadieron 100 µL de los siguientes fluoróforos: DAPI para visualización de ácidos nucleicos, WGA conjugada con Alexa Flúor 488 para visualizar carbohidratos y FilmTracer SYPRO Ruby para visualizar proteínas, a una concentración final 1 µg/ml, 20 µg/ml y 0.4X, respectivamente. El marcaje de la biopelícula se llevó a cabo en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. Seguido, cada pocillo se enjuagó tres veces con 400 µL de buffer PBS 1X pH:7.2 estéril y se dejó secar. Por último, la laminilla se visualizó en un microscopio de fluorescencia en el objetivo 20X a 341 nm de excitación y 452 de emisión para DAPI, 495 nm de excitación y 519 de emisión para WGA-Alexa flúor 488 y 450 nm de excitación y 610 nm de emisión para FilmTracer SYPRO Ruby. Las imágenes se capturaron con el software QCapture Pro7.0 y se realizaron los análisis morfométricos mediante el software ImageJ 1.52. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 6.0 comparando las medias de la densidad integrada de cada componente con subCMEB contra el control sin antibiótico mediante un ANOVA de dos factores con post hoc de Dunnet.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación

Se incluyeron 90 aislamientos recuperados de especímenes clínicos, predominando los aislamientos de sangre en un 92.22% (83/90), líquido cefalorraquídeo en un 3.33% (3/90) y otros sitios en un 4.44% (4/90). Todos los aislamientos fueron identificados previamente como *S. hominis* entre los años 2017 y 2018. La confirmación de la identificación a nivel especie se llevó a través de la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF obteniendo una concordancia del 100% (90/90) con la identificación previa de los aislamientos.

En cuanto a la clasificación de la subespecie se encontró que el 94.4% (85/90) de los aislamientos corresponden a *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH) y un 5.6% (15/90) a *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (SHN) de acuerdo con la susceptibilidad o resistencia a la novobiocina, respectivamente.

7.2 Nivel de producción de biopelícula

Los aislamientos de *S. hominis* son capaces de producir biopelícula de manera *in vitro* sobre superficies de poliestireno como se muestra en la figura 1. El 38.89% (35/90) de los aislamientos mostraron ser productores de biopelícula mientras que el 61.11% (55/90) no son productores. Dentro de los aislamientos productores de biopelícula predominan los fuertes productores con un 65.71% (23/35).

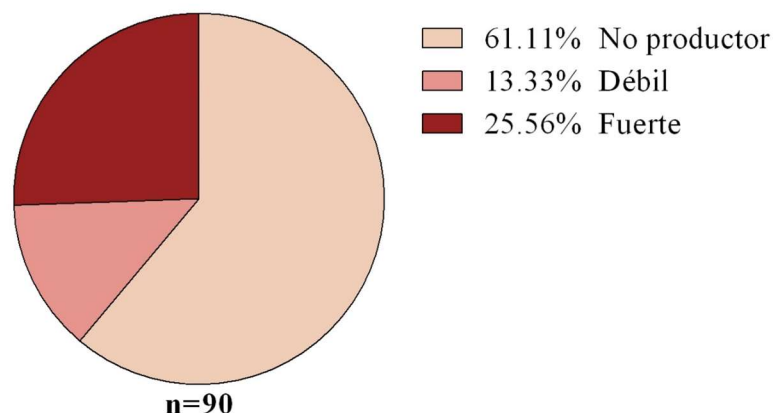


Figura 1. Nivel de producción de biopelícula en *S. hominis*. Frecuencia de los aislamientos en porcentaje del nivel de producción de biopelícula mediante la tinción con cristal violeta.

7.3 Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula.

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

Se observó mayor resistencia a los antibióticos de trimetoprima y oxacilina con una frecuencia de aislamientos resistentes mayor a un 70% (figura 2) en células planctónicas. No se observó resistencia a daptomicina, vancomicina y rifampicina. Se encontró baja frecuencia de aislamientos resistentes a linezolid (8.5%) y moderada a levofloxacin (20%).

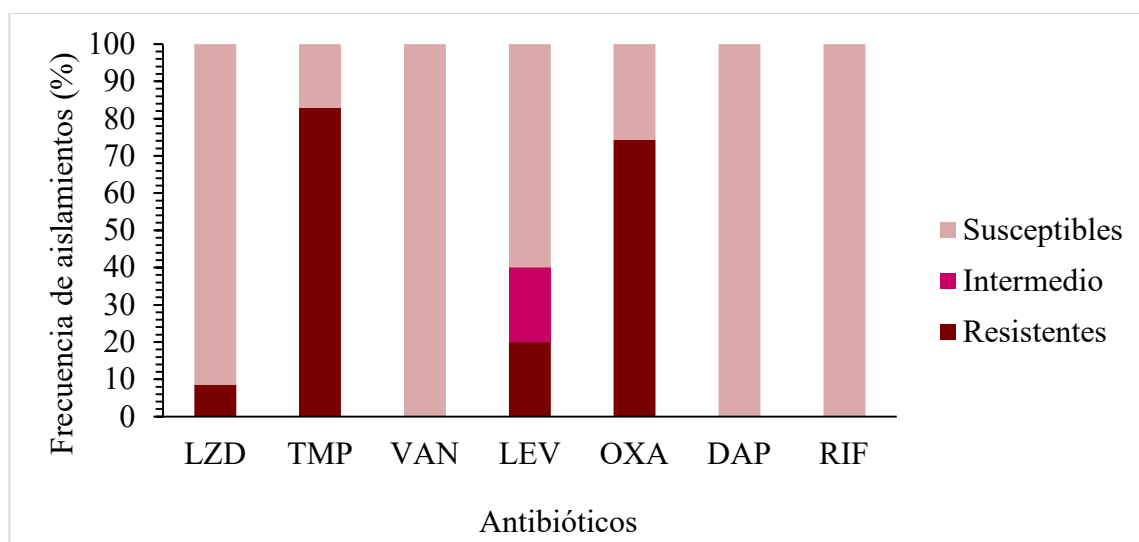


Figura 2. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas. La frecuencia de aislamientos susceptibles, intermedios y resistentes a los antibióticos se determinó mediante microdilución en células planctónicas de *S. hominis*. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacin, OXA: oxacilina, DAP: daptomicina, RIF: rifampicina.

Se observó un aumento en la resistencia a los antibióticos cuando la bacteria se encuentra dentro de la biopelícula a comparación de las células planctónicas (figura 3). La resistencia a antibióticos fue de al menos dos y hasta diez veces mayor en células de biopelícula a comparación de células planctónicas para linezolid, vancomicina, oxacilina, trimetoprima y levofloxacin. El único antibiótico efectivo en la erradicación de la biopelícula fue rifampicina. El antibiótico daptomicina se descartó del ensayo debido a la dificultad en determinar la CMEB debido a altas variaciones entre las repeticiones.

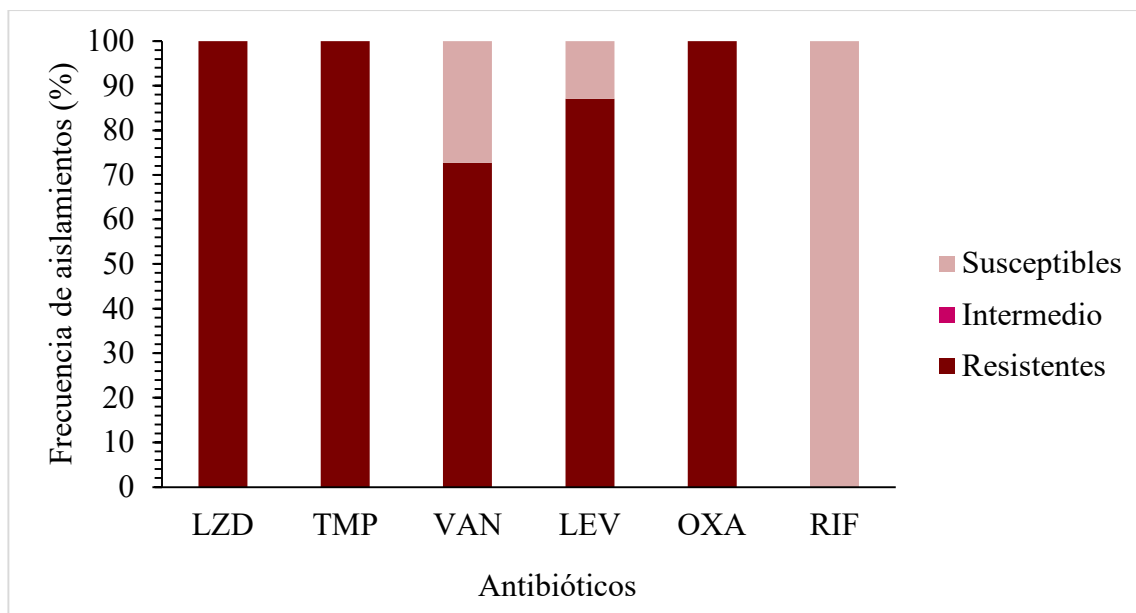


Figura 3. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula. La frecuencia de aislamientos susceptibles y resistentes a los antibióticos se determinó mediante microdilución utilizando el dispositivo Calgary en células de la biopelícula de *S. hominis*. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina, RIF: rifampicina.

7.4 Nivel de producción de la biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos

Se determinó el nivel de producción de la biopelícula con subCMI y subCMEB en tres aislamientos de *S. hominis* seleccionados con un perfil de susceptibilidad similar. Se utilizaron concentraciones de subCMI y subCMEB en el rango de $1/2$ a $1/64$ específicas para cada aislamiento. Se realizaron ensayos utilizando las primeras tres diluciones subCMI y subCMEB de cada antibiótico en cada uno de los tres aislamientos con la finalidad de obtener al menos una y hasta tres concentraciones subinhibitorias en la cual hubiera formación de la biopelícula. A pesar de que los aislamientos tienen un perfil de susceptibilidad similar, las concentraciones subinhibitorias en las cuales se obtuvo formación de biopelícula fue distinto para cada aislamiento. Como se muestra en la tabla, las subCMI y subCMEB en las cuales hubo formación de biopelícula se observan en color morado y las concentraciones en las cuales no hubo formación de biopelícula, pero si hubo crecimiento, se encuentran incoloras. Al obtener al menos una dilución en la cual hubo formación de biopelícula, ya no se continuó con más subCMI o subCMEB por lo cual no fueron determinados esos datos (ND).

Tabla 4. Concentraciones subCMI y subCMEB utilizadas para determinar la producción y composición de la biopelícula en *S. hominis*.

Aislamiento	Concentración	Antibiótico µg/mL						
		LZD	TMP	VAN	LEV	OXA	DAP	
17-1211	CMI	32	512	1	256	64	0.5	
	subCMI	1/2	16	256	0.5	128	32	0.12
		1/4	8	128	0.25	64	16	0.06
		1/8	4	64	0.125	32	8	0.03
		1/16	ND	32	ND	16	4	ND
		1/32	ND	16	ND	ND	2	ND
		1/64	ND	18	ND	ND	1	ND
	CMEB	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	ND	
	subCMEB	1/2	512	512	512	512	512	ND
		1/4	256	256	256	256	256	ND
		1/8	128	128	128	128	128	ND
		1/16	64	64	ND	64	64	ND
		1/32	32	32	ND	32	32	ND
		1/64	16	16	ND	16	16	ND
17-1214	CMI	32	512	1	128	256	0.5	
	subCMI	1/2	16	256	0.5	64	128	0.12
		1/4	8	128	0.25	32	64	0.06
		1/8	4	64	0.125	16	32	0.03
		1/16	2	ND	ND	8	16	ND
		1/32	1	ND	ND	4	8	ND
		1/64	0.5	ND	ND	2	4	ND
	CMEB	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	ND	
	subCMEB	1/2	512	512	512	512	512	ND
		1/4	256	256	256	256	256	ND
		1/8	128	128	128	128	128	ND
		1/16	64	64	ND	64	64	ND
		1/32	32	32	ND	32	32	ND
		1/64	16	16	ND	16	16	ND
17-1523	CMI	16	512	1	128	128	0.5	
	subCMI	1/2	8	256	0.5	64	64	0.12
		1/4	4	128	0.25	32	32	0.06
		1/8	2	64	0.125	16	16	0.03
		1/16	1	ND	ND	8	8	ND
		1/32	ND	ND	ND	ND	4	ND
		1/64	ND	ND	ND	ND	2	ND
	CMEB	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	ND	
	subCMEB	1/2	512	512	512	512	512	ND
		1/4	256	256	256	256	256	ND
		1/8	128	128	128	128	128	ND
		1/16	64	64	64	64	64	ND
		1/32	32	32	32	32	32	ND
		1/64	16	16	16	16	16	ND

La concentración subCMI y subCMEB en la cual no hubo formación de la biopelícula, pero sí crecimiento se encuentra en color blanco y la concentración en la cual, si hubo formación de la biopelícula, se observa sombreada en morado.

LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina, DAP: daptomicina, RIF: rifampicina, CMI: concentración mínima inhibitoria, CMEB: concentración mínima de erradicación de la biopelícula, ND: no determinado.

7.4.1 Células planctónicas

En el caso del nivel de producción de biopelícula con subCMI se observa en la figura 4, el aislamiento 17-1211 con subCMI de trimetoprima 32 µg/mL y 16 µg/mL, vancomicina a 0.5 µg/mL y 4 µg/mL, 2 µg/mL y 1 µg/mL de oxacilina hubo una diferencia estadísticamente significativa al apreciar un aumento en la formación de biopelícula. En el caso del aislamiento 17-1523 se observó una diferencia significativa con 1 µg/mL de linezolid, 8 µg/mL con levofloxacina y 2 µg/mL y 4 µg/mL de oxacilina al observar un aumento en la formación de biopelícula con estos antibióticos. En el caso del aislamiento 17-1214 a pesar de que visualmente se observa diferencia con linezolid y levofloxacina, no hubo una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control.

7.4.2 Células de la biopelícula

En cuanto al efecto en la formación de biopelícula con subCMEB, se observa en la figura 5 el aislamiento 17-1211 tuvo una diferencia estadísticamente significativa al reducir la formación de biopelícula con 128 µg/mL de vancomicina y 64 µg/mL de oxacilina. A pesar de que en este aislamiento se observa visualmente un aumento en la formación de biopelícula con las tres subCMEB de trimetoprima o una disminución como en el caso de 64 µg/mL linezolid y 256 µg/mL de vancomicina, estas concentraciones no fueron estadísticamente significativas. Asimismo, se observa un efecto similar en el aislamiento 17-1523 pero en este caso con 16 µg/mL de linezolid, 16 µg/mL 32 µg/mL y 64 µg/mL de vancomicina, 64 µg/mL, 32 µg/mL y 16 µg/mL de levofloxacina y 32 µg/mL de oxacilina. Por el contrario, en el aislamiento 17-1214 se observa aumento en la formación de biopelícula, pero únicamente con 16 µg/mL de oxacilina, aunque visualmente se observa una disminución en la formación de biopelícula con las tres subCMEB vancomicina éstas no son estadísticamente significativas.

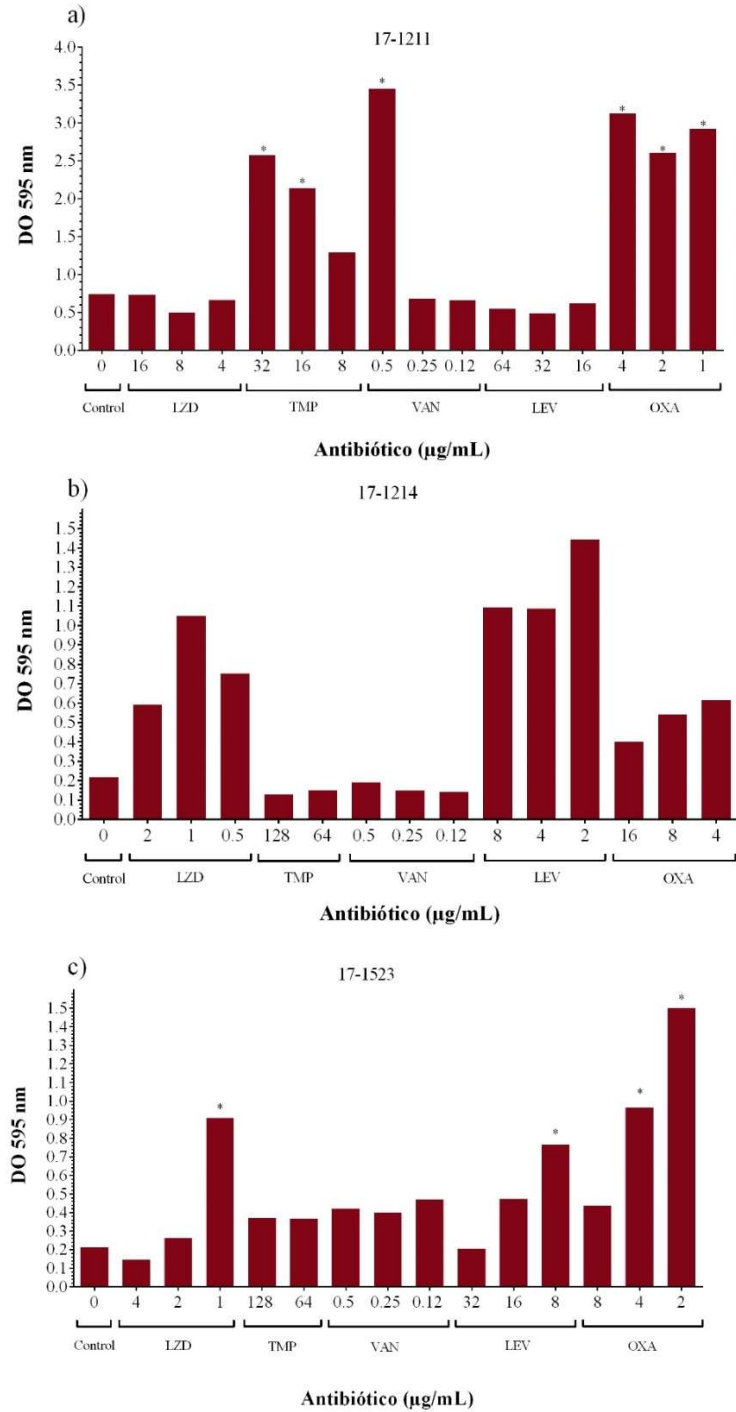


Figura 4. Nivel de producción de la biopelícula con subCMI en *S. hominis*. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta de cada tratamiento sin y con subCMI en tres aislamientos de *S. hominis* (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 fue determinada en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

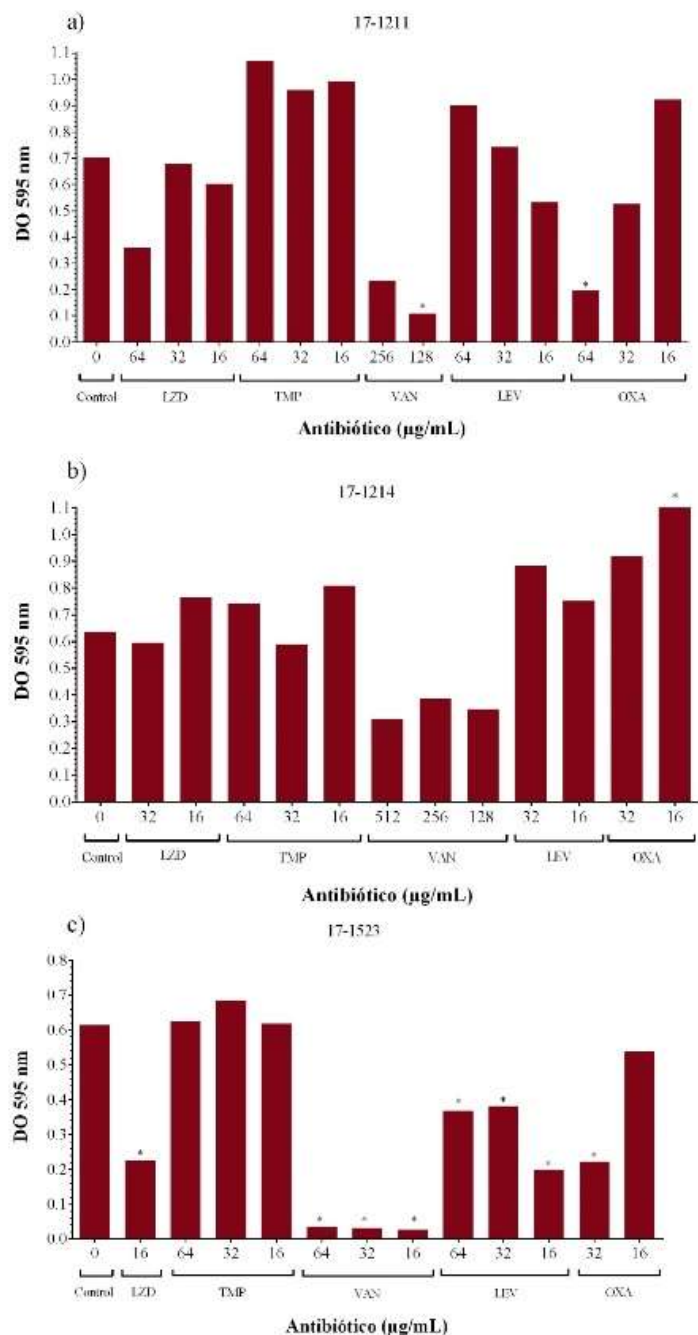


Figura 5. Nivel de producción de la biopelícula con subCMEB en *S. hominis*. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta de cada tratamiento sin y con subCMEB en tres aislamientos de *S. hominis* (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

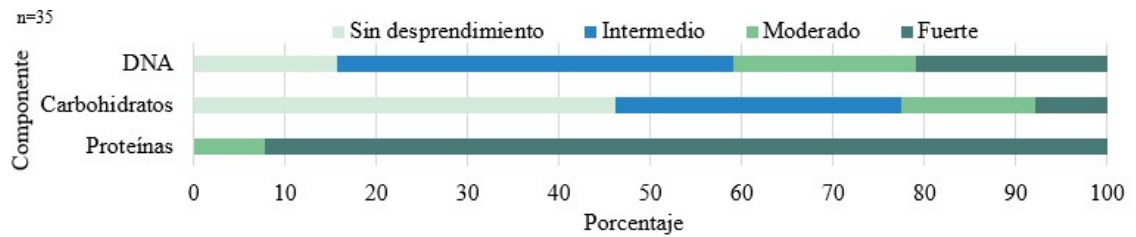


Figura 7. Composición de la biopelícula de *S. hominis*. El porcentaje de desprendimiento de cada componente se calculó comparando el control contra el tratamiento para desprender cada componente utilizando proteinasa k para proteínas, metaperyodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN.

7.5.2 Composición de la biopelícula con concentraciones subinhibitorias de antibióticos

7.5.2.1 Células planctónicas

La composición de la biopelícula con concentración subinhibitoria en los 3 aislamientos después del tratamiento enzimático para degradar específicamente cada componente fue muy variada, dependiendo del aislamiento la concentración y el antibiótico. Como se muestra en la figura 8 al aislamiento 17-1211 en el caso de carbohidratos tuvo una diferencia significativa al aumentar la OD₅₉₅ con 16 µg/mL y 8 µg/mL de trimetoprima lo cual indica que el tratamiento con el metaperyodato no tuvo un buen efecto para degradar carbohidratos indicando que disminuyó la proporción de este componente. Por el contrario, se observó una disminución de la OD₅₉₅ con 16 µg/mL y 32 µg/mL de levofloxacin lo cual indica que con estas concentraciones subinhibitorias el metaperyodato fue más eficiente para desprender los carbohidratos indicando que aumentó este componente en la biopelícula, En cuanto al ADN extracelular, se observó diferencia significativa en cuanto a la OD₅₉₅ con 32 µg/mL 16 µg/mL y 8 µg/mL de trimetoprima, observando un aumento en la OD₅₉₅ indicando que disminuyó la proporción de este componente. Por el contrario, con 64 µg/mL de levofloxacin la OD₅₉₅ disminuyó indicando que con esta concentración la DNasa I ejerció un mejor efecto indicando que aumentó la proporción de este componente. A diferencia con las proteínas, con ninguna concentración de ningún antibiótico hubo una diferencia significativa pero sí se puede observar una baja OD₅₉₅ en todas las concentraciones lo cual indica que la proteína si tuvo un buen efecto al desprender este componente, indicando que las proteínas son el componente más abundante de este aislamiento.

Por el contrario, podemos observar un panorama distinto con el aislamiento 17-1214. En cuanto a la composición del control se observan densidades ópticas muy similares con los 3 componentes indicando que tienen una proporción similar en la composición de este aislamiento a comparación del aislamiento 17-1211 en donde las proteínas son el principal componente al tener menor OD₅₉₅ y a pesar de que los carbohidratos y el ADN tienen mayor OD₅₉₅ indicando que se encuentran en menor cantidad, su proporción es muy similar. En cuanto a la composición del aislamiento 17-1214 únicamente se observa diferencias significativas en la composición de carbohidratos observando un aumento en la OD₅₉₅ con 1 µg/mL y 0.5 µg/mL del linezolid, 8 µg/mL, 4 µg/mL y 2 µg/mL de levofloxacina indicando que la proporción de este componente disminuyó. En cuanto al ADN y proteínas no se observó una diferencia significativa con ninguna concentración.

Por último, en el aislamiento 17-1523 la composición del control tiene densidades ópticas muy similares de los 3 componentes indicando que los 3 tienen una proporción muy similar en la composición. En cuanto a la DO₅₉₅ de los carbohidratos se observó un aumento con la mayoría de las concentraciones de los 5 antibióticos probados a excepción de 1 µg/mL con linezolid, indicando que disminuyó la proporción de este componente. Para las proteínas se observa un aumento en las DO₅₉₅ para 128 µg/mL y 64 µg/mL de trimetoprima, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL y 0.12 µg/mL de vancomicina, así como 32 µg/mL y 16 µg/mL de levofloxacina, lo cual indica que la proporción de este componente disminuyó, resultados contrario a lo observado con los aislamientos 17-1211 y 17-1214.

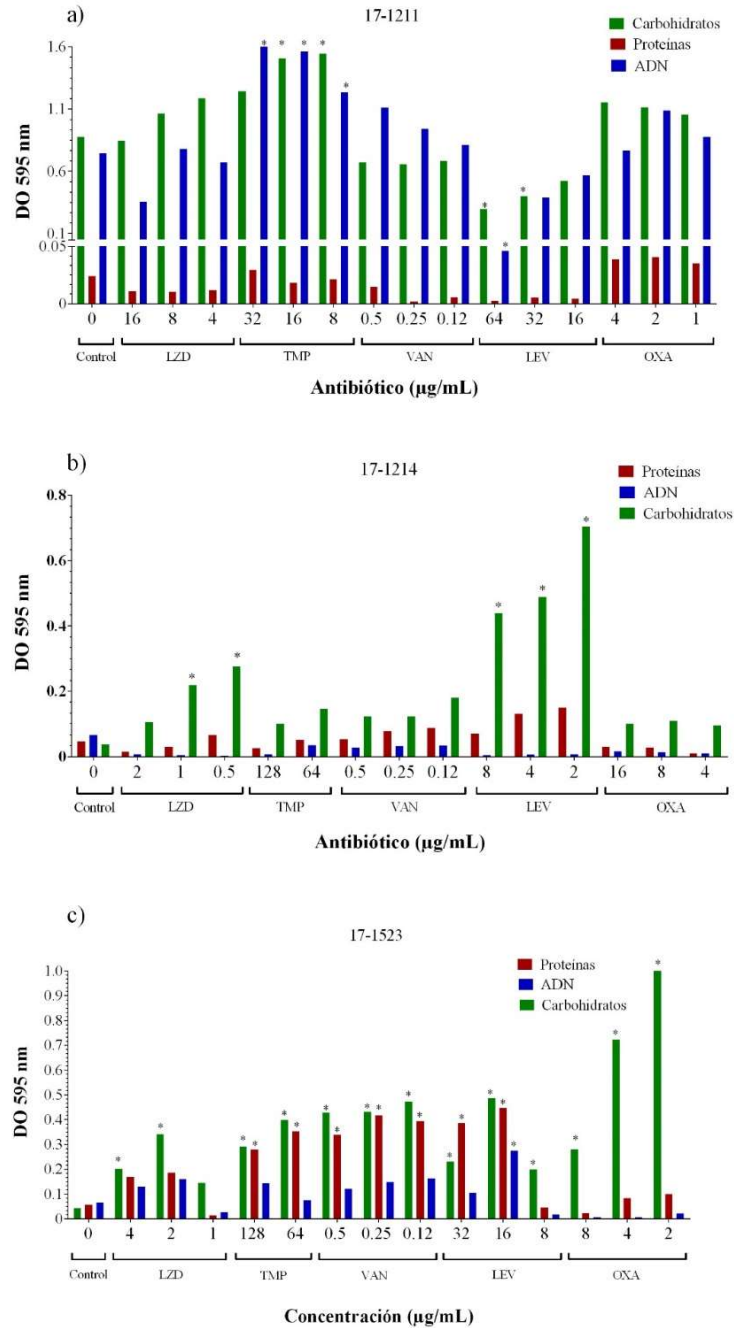


Figura 8. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta con subCMI en tres aislamientos de *S. hominis* (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 de cada componente después del tratamiento con proteínasa k para desprender proteínas, metaperiodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN de cada aislamiento productor de biopelícula se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

7.5.2.2 Células de la biopelícula

En el caso de la composición con concentración subinhibitoria de la biopelícula, de igual forma se observan resultados muy variados dependiendo del aislamiento, del antibiótico y de la concentración, como se muestra en la figura 9. El aislamiento 17-1211 aumentó significativamente en la DO_{295} de los carbohidratos con 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$ y 16 $\mu\text{g/mL}$ de trimetoprima y 64 $\mu\text{g/mL}$ con levofloxacina indicando que la proporción de este componente disminuyó. Por el contrario, se observa una disminución en la DO_{595} estadísticamente significativa con 64 $\mu\text{g/mL}$ linezolid, 256 $\mu\text{g/mL}$ y 128 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, y 64 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina indicando que con estas concentraciones aumentó la proporción de carbohidratos. Para las proteínas solo linezolid con 64 $\mu\text{g/mL}$ se observó una disminución, lo cual indica que aumentó la proporción de proteínas con estas concentraciones. Comparando los resultados del control de este aislamiento, el ensayo con subCMI (24 horas) contra el ensayo subCMEB (48 h) se observa que al comparar subCMI con subCMEB disminuyó la DO_{595} del ADN indicando que a las 48 horas aumenta la proporción de este componente y manteniéndose estable los carbohidratos y las proteínas.

En el aislamiento 17-1214 a las 24 horas se observa un aumento en la densidad óptica de carbohidratos y proteínas indicando que a las 48 horas estos componentes disminuyen. Se observa que la concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$ de levofloxacina y 16 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina un aumento en la DO_{595} indicando que disminuye la proporción de este componente. En el caso de las proteínas, únicamente la concentración de 256 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina se aprecia un aumento en la DO_{595} indicando que se disminuye este componente. Para el ADN con 256 $\mu\text{g/mL}$ y 128 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina se aprecia un aumento en la densidad óptica indicando que este componente disminuye. En cuanto al aislamiento 17-1523 el control comparado de las 48 h al igual que el aislamiento 17-1214 se observa un aumento en la DO_{595} de los carbohidratos indicando que este componente disminuye. En cuanto a la DO_{595} de los carbohidratos con 16 $\mu\text{g/mL}$ de linezolid, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$ y 16 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina y 32 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina se observa una disminución en la DO_{595} indicando que este componente aumentó su proporción. Por el contrario, con 16 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina se observó un aumento en la DO_{595} indicando que este componente disminuyó. En el caso de proteínas y ADN no se observó una diferencia significativa únicamente con las 3 concentraciones de vancomicina.

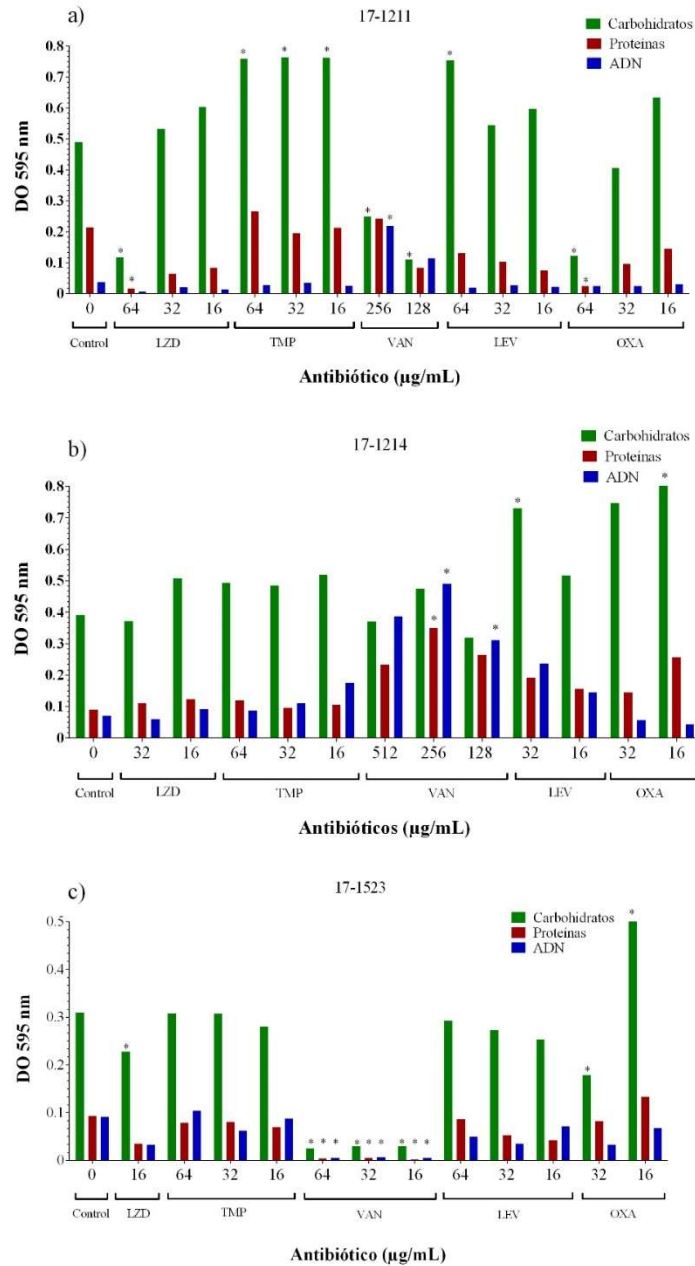


Figura 9. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad óptica de la tinción con cristal violeta con subCMEB en tres aislamientos de *S. hominis* (a) 17-1211, (b) 17-1214 y (c) 17-1523 de cada componente después del tratamiento con proteinasa k para desprender proteínas, metaperiodato de sodio para carbohidratos y DNasa I para ADN de los aislamientos seleccionados productores de biopelícula se determinó en un lector de microplacas a 595 nm de absorbancia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

7.6 Estructura de la biopelícula por microscopía

Se seleccionó un aislamiento el 17-1211 para visualizar la estructura de la biopelícula por microscopía de fluorescencia, como se observa en la figura 10 la composición de la biopelícula con una concentración subinhibitoria de antibióticos muestra una diferencia significativa en la densidad integrada de las imágenes captadas por microscopía en los 3 componentes con 16 µg/mL de linezolid y 64 µg/mL de levofloxacina y 32 µg/mL de trimetoprima y únicamente una diferencia significativa en la proporción de carbohidratos con 0.5 µg/mL y 0.25 µg/mL de vancomicina y 4 µg/mL de oxacilina.

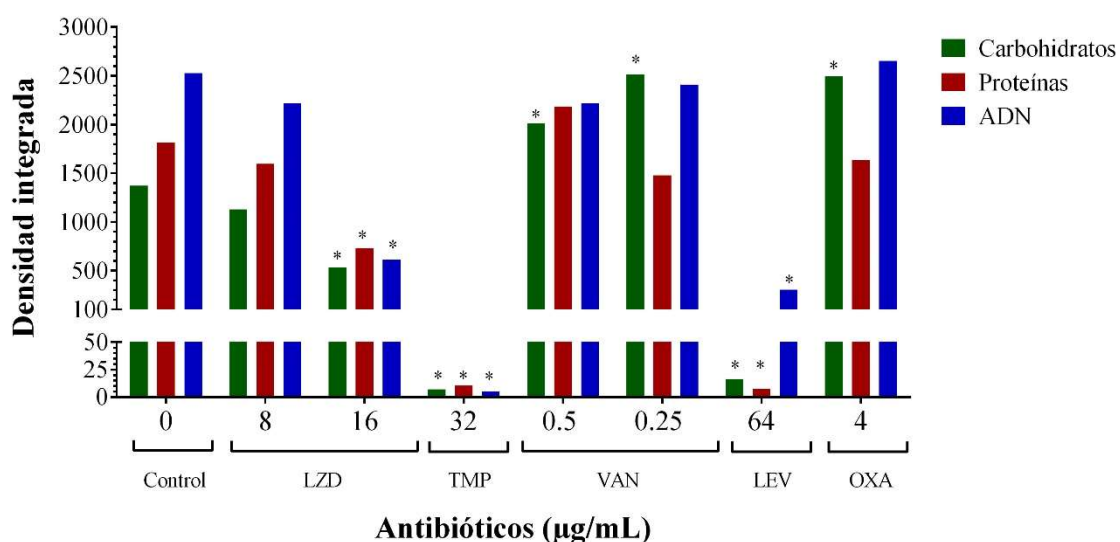


Figura 10. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad integrada del análisis de las micrografías con subCMI en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211) de cada componente después del marcaje con Sypro Ruby para proteínas, WGA con Alexa fluor 488 para carbohidratos y DAPI para ADN del aislamiento productor de biopelícula se determinó con un microscopio de fluorescencia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

7.6.1 Células planctónicas

Se seleccionaron imágenes representativas para hacer una comparación visual de una concentración subinhibitoria para observar este efecto. Como se observa en la figura 11, el control con 24 horas de incubación se observa una matriz densa de la biopelícula teñido con DAPI que evidencia el ADN tanto intra como extracelular, así como WGA y SYPRO Rubi que evidencian una proporción similar lo cual se observa en verde los carbohidratos y en rojo las proteínas. Con 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de linezolid se aprecia una reducción de la densidad de la biopelícula así como la disminución de carbohidratos y un aumento en la proteínas. En el caso de trimetoprima se aprecia claramente una reducción considerable de la biopelícula pudiéndose clasificar como una concentración de erradicación sin embargo, se alcanzan a apreciar algunas células y pequeños acúmulos adheridos a la cámara lo cual indica que quedan células sobreviviendo a esa concentración y que éstas pudieran no ser detectadas por espectrofotometría. En el caso de vancomicina con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una ligera disminución en cuanto a la densidad de la biopelícula y se aprecia claramente un aumento en las proteínas y una disminución con los carbohidratos resultados contrastantes como se observan con 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxacilina en la cual se aprecia un aumento en los carbohidratos y una disminución en las proteínas aunque se aprecia una densidad similar al control.

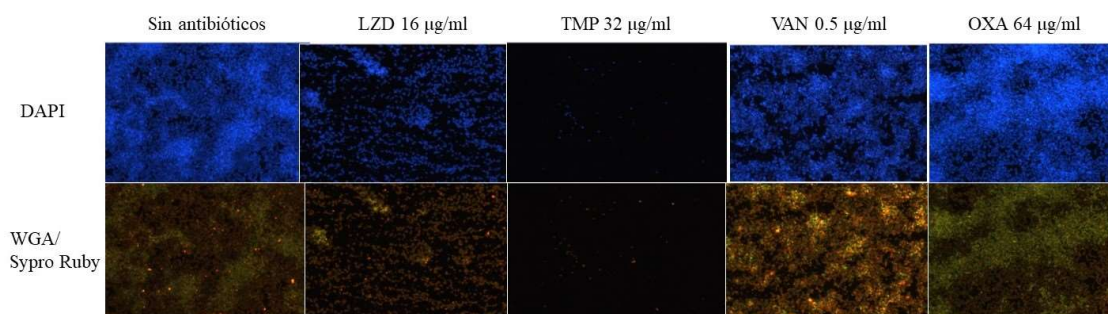


Figura 11. Composición de la biopelícula de un aislamiento de *S. hominis* con antibióticos. Imágenes representativas con diferencias significativas comparando el control y los tratamientos con subCMI por microscopia de fluorescencia en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211). En azul se observa el marcaje de ADN con DAPI, en verde el marcaje de carbohidratos con WGA conjugado con Alexa flúor 488 y en anaranjado las proteínas macadas con Sypro Ruby. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMI contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

7.6.2 Células de la biopelícula

En el caso de las células de la biopelícula, la composición se vio afectada de manera diferente esto se observa principalmente una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la composición de proteínas y carbohidratos para todos los antibióticos probados en al menos una dilución subCMI como se aprecia en la figura 12. Se aprecia visualmente una diferencia en cuánto al aumento en el ADN como en el caso de 64 µg/mL de trimetoprima y 32 µg/mL de vancomicina sin embargo estas no fueron estadísticamente significativas. Únicamente con 256 µg/mL del levofloxacino y 64 µg/mL de oxacilina se obtuvo una diferencia significativa al disminuir la proporción de ADN.

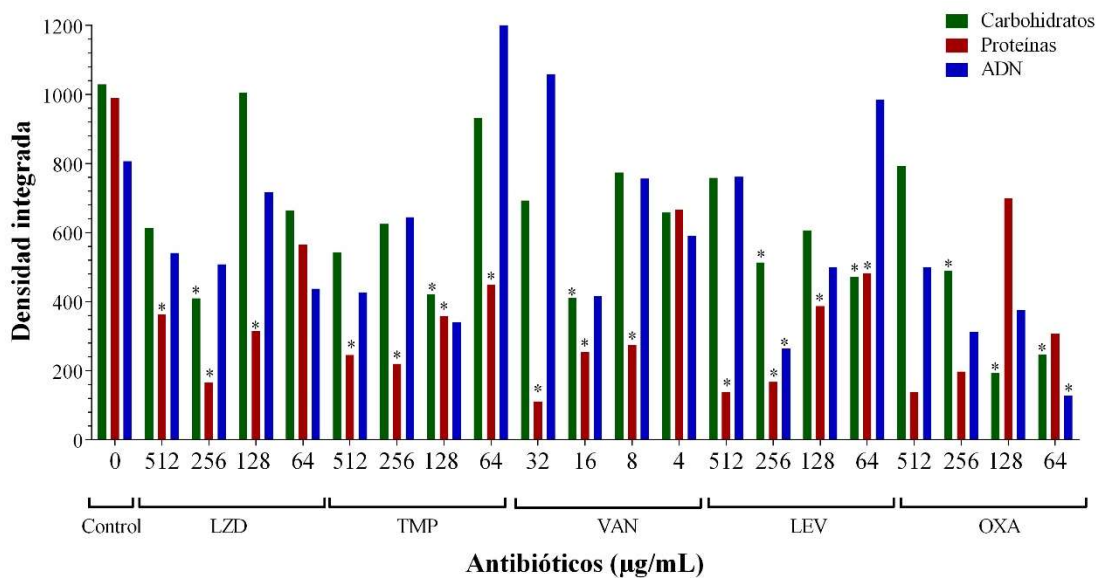


Figura 12. Composición de la biopelícula de aislamientos de *S. hominis* con antibióticos. La densidad integrada del análisis de las micrografías de con subCMEB en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211) de cada componente después del marcaje con Sypro Ruby para proteínas, WGA con Alexa fluor 488 para carbohidratos y DAPI para ADN del aislamiento productor de biopelícula se determinó con un microscopio de fluorescencia. LZD: linezolid, TMP: trimetoprima, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina, OXA: oxacilina. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

Las imágenes representativas de las diferencias significativas con subCMEB muestran una reducción en cuanto a la densidad de la biopelícula comparada con el control. Como se aprecia en las imágenes de la figura 13, se observan abundantes células adheridas, pero sin aparente formación tridimensional de la biopelícula. A comparación, el control con 48 horas de crecimiento se aprecia un aumento en las proteínas y una disminución en carbohidratos a comparación de la biopelícula de 24 horas.

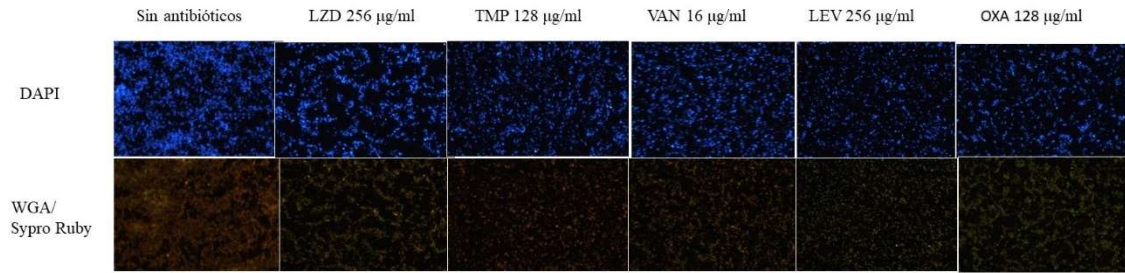


Figura 13. Composición de la biopelícula de un aislamiento de *S. hominis* con antibióticos. Imágenes representativas con diferencias significativas comparando el control y los tratamientos con subCMEB por microscopia de fluorescencia en un aislamiento de *S. hominis* (17-1211). En azul se observa el marcaje de ADN con DAPI, en verde el marcaje de carbohidratos con WGA conjugado con Alexa fluor 488 y en anaranjado las proteínas macadas con Sypro Ruby. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos factores con *post hoc* de Dunnet comparando los tratamientos con subCMEB contra el control sin antibióticos. * $p \leq 0.05$

7.7 Detección de genes asociados a la formación de la biopelícula y resistencia a los antibióticos

Se determinó la presencia del gen *mecA* asociado a la resistencia a meticilina y la resistencia a linezolid detectando el gen *cfr*. Se encontró la presencia del gen *mecA* en el 82.22% de los aislamientos con una concordancia entre la presencia del gen *mecA* y la resistencia a oxacilina de un 98.88% ya que se encontró un aislamiento resistente pero *mecA* negativo. Además, se obtuvo una concordancia del 100% entre los aislamientos susceptibles a oxacilina y la ausencia del gen *mecA*. En cuanto al gen *cfr*, se encontró la presencia de este gen en el 100% de los aislamientos resistentes ($n=3$), mientras que en los aislamientos susceptibles la concordancia fue del 100% entre la susceptibilidad a linezolid y la ausencia del gen.

Se determinó la presencia de los genes *icaA* e *icaD* asociados a la producción de PNAG componente de la biopelícula. No se detectó la presencia de estos dos genes en ninguno de los aislamientos productores de biopelícula ($n=35$). Mientras que se obtuvo una concordancia del 100% de los aislamientos no formadores de la biopelícula con la ausencia de los genes *icaA* e *icaD* (Tabla 5).

Tabla 5. Genes asociados a farmacorresistencia, producción de biopelícula y concordancia con el perfil de susceptibilidad y formación de biopelícula.

	Resistencia a antibióticos				Biopelícula		
	<i>mecA</i> (n)	Susceptibilidad a oxacilina % (n)	<i>cfr</i> (n)	Susceptibilidad a linezolid	<i>icaA</i> (n)	<i>icaD</i> (n)	Formación de biopelícula
Positivo	82.22 (74/90)	98.88 (73/74) ^a	33.33 (3/90)	100 (3/3)	0.0 (0/90)	0.0 (0/90)	0.0 (0/35)
Negativo	17.77 (16/90)	100 (16/16)	96.6 (87/90)	100 (87/87)	100 (90/90)	100 (90/90)	100 (55/55)

^a Un aislamiento resistente y *mecA* negativo

8. DISCUSIÓN

El principal grupo de bacterias comensales de la piel en humanos y animales sanos son los estafilococos coagulasa negativos (ECN), entre ellos se encuentra *Staphylococcus hominis* (Heilmann *et al.*, 2019). Al igual que el resto de las más de 50 especies de este grupo, *S. hominis* es un patógeno oportunista destacando en pacientes inmunocomprometidos siendo la tercera bacteria más frecuentemente aislada a partir de especímenes clínicos asociados con el uso de dispositivos médicos invasivos, principalmente bacteriemias relacionadas a catéter (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013; Ruiz-Giardin *et al.*, 2019). Una identificación rápida y oportuna es importante para un correcto tratamiento. En este trabajo se incluyeron 90 aislamientos clínicos de *S. hominis* recuperados principalmente de sangre 92.22% (83/90), líquido cefalorraquídeo en un 3.33% (3/90) y otros sitios en un 4.44% (4/90). La confirmación de la identificación a nivel especie se llevó a cabo a través de MALDI-TOF MS con un 100% (90/90) de concordancia. Esta metodología ha mostrado tener alta sensibilidad y especificidad al identificar las seis especies más frecuentes del género *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* y *S. lugdunensis*) con una concordancia mayor al 96% de las distintas especies del género *Staphylococcus* y hasta un 100% con las especies más frecuentes, comparado con métodos moleculares que se consideran las pruebas “gold standard”, sin embargo, su costo es elevado. MALDI-TOF MS cuenta con mayor discriminación a comparación de las pruebas bioquímicas y fenotípicas. Además, estas últimas, a pesar de que pueden ser costosas, requieren de varios días y no cuentan con suficiente poder discriminativo para distinguir entre características bioquímicas de las especies de *Staphylococcus* más relacionadas (Elbehiry *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2015).

Kloss y colaboradores describieron por primera vez a *S. hominis* como la segunda bacteria más predominante en la piel (Wesley E. Kloos & Schleifer, 1975). Años más tarde, dos subespecies se describieron, *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH) y *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (SHN). SHN ha sido la subespecie reportada como más virulenta y multifarmacorresistente (Ahmed *et al.*, 2017; d'Azevedo *et al.*, 2008). SHN puede distinguirse de SHH principalmente por la resistencia a novobiocina (Wesley E. Kloos *et al.*, 1998). En este trabajo se encontró una predominancia por SHH, encontrando que el

94.4% (85/90) de los aislamientos corresponden a esta subespecie, mientras que un 5.6% (15/90) corresponde a SHN. A pesar de que se ha reportado a SHN como la subespecie más virulenta y multifarmacorresistente, su frecuencia como agente etiológico de distintas infecciones es baja (Chaves *et al.*, 2005a; Roy *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en este estudio, incluso la frecuencia fue menor al encontrar únicamente un 5.6% de SHN, a comparación de Ahmed y colaboradores en donde encontraron una frecuencia del 19.29% (Ahmed *et al.*, 2017). Hay escasos reportes en donde se han trabajado con más de 32 y hasta 67 aislamientos de esta subespecie (Chaves *et al.*, 2005b; d'Azevedo *et al.*, 2008).

Al ser parte del microbiota de la piel, *S. hominis* puede colonizar con facilidad al paciente en el momento de la colocación de un dispositivo médico invasivo como en el caso de catéter venoso central, en el cual las bacterias se agregan y forman las biopelículas (Zheng *et al.*, 2018). Las infecciones que involucran a bacterias formadoras de biopelícula son de gran importancia debido a la gran dificultad que se tiene en el tratamiento. En este trabajo, el 38.89% (35/90) de los aislamientos mostraron ser productores de biopelícula mientras que el 61.11% (55/90) se clasificaron como no productores. Dentro de los aislamientos productores de biopelícula predominan los fuertes productores con un 65.71% (23/35) (figura 1). Los estudios disponibles relacionados a la producción de biopelícula de esta bacteria son limitados y los porcentajes de aislamientos productores de biopelícula son muy variables. *S. hominis* no destacaba por la producción de biopelícula, incluso no se reportaban aislamientos productores o eran poco frecuentes y con débil producción (de Allori *et al.*, 2006; Garza-González *et al.*, 2011). Investigaciones recientes han reportado una frecuencia de aislamientos clínicos de *S. hominis* productores de biopelícula con una variación entre 50-90% de los aislamientos analizados (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015; Szczuka *et al.*, 2015). En este trabajo se encontró que el 38.89% de los aislamientos fueron productores de biopelícula, lo cual está por debajo de lo reportado. Estas diferencias tan notables de la formación de la biopelícula en *S. hominis* entre las investigaciones reportadas sugieren que la bacteria ha adquirido o potenciado la capacidad de producir biopelícula conforme se ha adaptado a su entorno, tomando importancia como un patógeno oportunista relevante y no sólo como un comensal de la piel como se solía pensar (Michels *et al.*, 2021). Existen otros factores a considerar para tratar de explicar

estas diferencias entre la capacidad de formar biopelícula en *S. hominis* empezando por el origen y características de los aislamientos utilizados, a pesar de ser aislamientos clínicos, los distintos reportes incluyen muestras de sangre, catéteres, líquido cefalorraquídeo, heridas, distintos tipos de implantes, incluso aislamientos comensales. Esta variabilidad en el origen de las muestras hace difícil la comparación y puede ser una de las causas de esta variación. Además, cabe destacar que la falta de estandarización en la metodología empleada influye en este resultado. La metodología más utilizada para determinar la formación de biopelícula *in vitro* en *Staphylococcus* spp. es la propuesta por Christensen en 1988, mediante la tinción con cristal violeta utilizando una microplaca de 96 pocillos de poliestireno y clasificando de acuerdo con la densidad óptica obtenida. A pesar de esto, se ha tratado de optimizar la metodología para las distintas especies, encontrando variaciones en los medios utilizados como caldo soya o infusión cerebro corazón, suplementos con distintas concentraciones de glucosa o NaCl, diferentes reactivos utilizados para lavados (PBS, agua, medio de cultivo, etc.), diferentes formas de fijación (calor, metanol, glutaraldehído, etc.) o sin fijar y hasta los criterios de clasificación son muy variados (DO, índice de biopelícula, etc.) (Azeredo *et al.*, 2017; A. K. Singh *et al.*, 2017).

La producción de la biopelícula esta asociada con una mayor virulencia debido a que la bacteria queda protegida de las defensas del hospedador y de agentes antimicrobianos, propiciando la persistencia y dificultando su erradicación. La biopelícula es un agregado de células bacterianas que se encuentran embebidas en una matriz polimérica extracelular, compuesta por productos secretados por la misma bacteria tales como carbohidratos, proteínas, ADN extracelular, lípidos y componentes del microambiente en el que se encuentra (Limoli *et al.*, 2015). A pesar de que la estructura está conformada por distintas moléculas, la principal son los carbohidratos, estos juegan un rol en la adhesión y estructura principalmente la poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG). Este carbohidrato, fue identificado por primera vez en *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 1994) y poco tiempo después en *S. aureus* (Cramton *et al.*, 1999), siendo el componente predominante, seguido de proteínas y en menor proporción ADN extracelular. Resultados similares se han encontrado en otras bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas por mencionar algunas *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas. aeruginosa*, *Klebsiella*

pneumoniae, entre otras (Roux *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). La composición de la biopelícula en los aislamientos de *S. hominis* analizados en este trabajo mostró ser heterogénea, ya que se observó que los aislamientos podrían contener en la misma proporción carbohidratos, proteínas y ADN o podría variar entre ellos, obteniendo distintas combinaciones de los tres componentes en cada aislamiento individual (figura 6). Aunque las proteínas fue el componente en mayor abundancia, algunos aislamientos mostraron tener igual proporción de carbohidratos y proteínas, lo cual indica que la composición es dependiente del aislamiento. A pesar de esta heterogeneidad, se observó una tendencia por las proteínas, mostrando altos valores de desprendimiento de la biopelícula al ser tratadas enzimáticamente con proteinasa, con un promedio de porcentaje de desprendimiento mayor al 80%. Por el contrario, los porcentajes de desprendimiento para los carbohidratos y ADN extracelular varió entre 5-80% (figura 7). No se encontró relación en cuanto a la producción de biopelícula y la presencia de los genes analizados *icaA* e *icaD*, debido a que en los aislamientos productores de biopelícula de *S. hominis* no se encontró la presencia de estos genes. Szczuka y colaboradores reportaron una composición heterogénea de la biopelícula de 56 aislamientos de *S. hominis*, donde las proteínas se encontraron en mayor abundancia seguido de carbohidratos y en menor proporción ADN extracelular. Incluso las proporciones de éstos diferían entre cada aislamiento. Además, se encontró una alta prevalencia del locus *icaADBC* que codifica la síntesis de PIA, aunque solo la mitad de los aislamientos fueron productores de biopelícula (Szczuka *et al.*, 2015). Mendoza y colaboradores reportaron que de los 67 aislamientos estudiados todos contenían el gen *icaD* y 5 aislamientos contenían todos los genes del locus *icaADBC*. La mayoría de los aislamientos se caracterizaron como fuertes productores de biopelícula. A pesar de contener el gen *icaD*, éste tuvo una baja expresión y proteinasa K, DNasa y NaIO₄ tuvieron un efecto similar en el desprendimiento de la biopelícula observando una composición heterogénea y dependiente del aislamiento (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en cuanto a la composición de *S. hominis* en estas investigaciones son similares a lo encontrado en este trabajo. Por el contrario, en ninguno de los aislamientos analizados se encontró la presencia de los genes *icaA* e *icaD*, a pesar de que los reportes indican que al menos en un 50% de los aislamientos productores cuentan con estos genes. Estos resultados siguen la búsqueda

de otros genes involucrados en la formación de biopelícula sobre todo asociados a una biopelícula compuesta principalmente por proteínas.

Uno de los mayores retos al tratar con infecciones relacionadas a ECN es la dificultad de tratamiento debido a la resistencia a los fármacos antimicrobianos y ésta aumenta si se ve involucrada la producción de biopelícula. Se obtuvo resistencia a trimetoprima y oxacilina con una frecuencia de aislamientos resistentes mayor a un 70% (figura 2) en células planctónicas. No se observó resistencia a vancomicina, daptomicina y rifampicina. Se encontró baja frecuencia de aislamientos resistentes a linezolid (8.5%) y moderada a levofloxacina (20%). Resultados similares en cuanto a la resistencia y susceptibilidad obtenida a los antibióticos probados en este estudio se han reportado en diferentes investigaciones, obteniendo resultados esperados (De Vecchi *et al.*, 2018; Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015). Los aislamientos resistentes a oxacilina obtuvieron una concordancia del 98.88% con la presencia del gen *mecA*. La resistencia a oxacilina es de gran relevancia, debido a que aislamientos resistentes a este antibiótico se clasifican como resistentes a meticilina, lo cual implica una resistencia no solo a los antibióticos β -lactámicos, si no a otras clases de antibióticos. Esto se debe a que la resistencia a meticilina es dada por una penicilina de unión a penicilina alterada (PBP2a) codificada por el gen *mecA* que se encuentra dentro de un casete cromosómico estafilocócico (SCCmec), en el cual se han detectado 14 tipos, debido a que cuentan con distintos complejos *mec* (consiste *mecA*, genes regulatorios y secuencias de inserción) así como recombinasas del casete cromosómico (*ccr*). Este casete puede contener genes que codifican a distintas clases de antibióticos como macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, entre otros (Saber *et al.*, 2017; Uehara, 2022). Se ha reportado que existen genes homólogos al gen *mecA*, como *mecC*, el cual se ha encontrado en algunas especies de *Staphylococcus* las cuales son meticilina resistentes pero *mecA* negativo (Loncaric *et al.*, 2019). En este estudio se encontró un aislamiento que presenta resistencia a oxacilina, clasificado como meticilina resistente pero que no presenta el gen *mecA*. Esto se puede deber a que este aislamiento podría portar un gen alternativo como *mecC* el cual le confiere la resistencia a este antibiótico. Sin embargo, la confirmación mediante PCR punto final con los iniciadores adecuados es necesaria.

Los aislamientos analizados en este trabajo mostraron altos porcentajes de susceptibilidad a vancomicina, linezolid y daptomicina. Su importancia reside en que son antibióticos clasificados como de último recurso en el tratamiento de infecciones resistentes a otros antibióticos, en donde se destaca la vigilancia de los aislamientos resistentes a estos antibióticos (Guo *et al.*, 2020). Se ha reportado baja resistencia a linezolid, vancomicina y daptomicina en aislamientos clínicos de *S. hominis*, concordando con los resultados obtenidos en este trabajo (Brazeau *et al.*, 2020; Lara M. de Almeida *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2019). Únicamente el 8.5% de los aislamientos presentó resistencia a linezolid, y se obtuvo una concordancia del 100% con la presencia del gen *cfr*, el cual codifica una metiltransferasa que cataliza la metilación de la subunidad ribosomal 23S para inhibir el mecanismo de acción del antibiótico (Corinna Kehrenberg *et al.*, 2005). Es de suma relevancia el monitoreo de la resistencia a linezolid en aislamientos de ECN debido a que a pesar de que la mayoría de los aislamientos resistentes presentan este gen en el cromosoma o presentan mutaciones puntuales en el ribosoma y por esta vía es más lenta su diseminación, se han reportado en distintas especies de ECN la presencia del gen *cfr* en plásmidos, los cuales se diseminan más fácil y puede transferirse horizontalmente a otras bacterias patógenas (Morales *et al.*, 2010).

Otro factor importante implicado en la resistencia a los antibióticos es la formación de la biopelícula, ya que crea una barrera física que le confiere a las células bacterianas protección del ambiente externo, incluidos los fármacos antimicrobianos. Aproximadamente el 80% de infecciones bacterianas crónicas y recurrentes es debido a la formación de la biopelícula bacteriana. Las células bacterianas dentro de la biopelícula han mostrado tener resistencia a los antibióticos hasta 1,000 veces mayor a comparación de las células planctónicas (Mah, 2012). En este trabajo, se observó un aumento en la resistencia a la mayoría de los antibióticos en las bacterias dentro de la biopelícula a comparación de las células planctónicas (figura 3). La resistencia a antibióticos fue de al menos dos y hasta diez veces mayor para los antibióticos linezolid, vancomicina, oxacilina, trimetoprima y levofloxacina, concordando con reportes previos (Girard *et al.*, 2010; Mendoza-Olazarán *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2010). El único antibiótico efectivo en la erradicación de la biopelícula fue rifampicina, lo cual concuerda con investigaciones previas que demuestran un mejor desempeño que otros antibióticos en biopelículas

bacterianas *in vitro* (Zimmerli & Sendi, 2019). El antibiótico daptomicina se descartó del ensayo por la dificultad en determinar la CMEB debido a altas variaciones entre las repeticiones. La actividad *in vitro* de la daptomicina para determinar la susceptibilidad es potenciada al incrementar la concentración de Ca^{2+} al realizar ensayos en caldo de acuerdo con la metodología descrita por el CLSI (CLSI, 2022; Fuchs *et al.*, 2000). Se ha reportado que la formación de biopelícula es afectada por cationes multivalentes, Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} . El calcio puede afectar la formación de la biopelícula bacteriana de manera negativa como la inhibición de la formación de biopelículas en *Bacillus subtilis* (Nishikawa & Kobayashi, 2021) así como de manera positiva al potenciar la formación de biopelícula en *Vibrio fischeri* (Tischler *et al.*, 2018) y *Pseudomonas aeruginosa* (Sarkisova *et al.*, 2005). En *S. hominis* es necesario profundizar en el efecto del calcio sobre la biopelícula debido a la alta variación tanto positiva como negativa al tratar de determinar la CMEB con daptomicina debido a la suplementación del medio. Aún no se ha esclarecido el aumento en la resistencia de las bacterias dentro en la biopelícula. Estudios sugieren que la composición de la biopelícula influye para que el antibiótico no pueda ejercer efecto sobre las células bacterianas, esto se puede deber a la estructura dependiendo de su composición o las interacciones entre los componentes de la matriz con el antibiótico haciéndolo menos efectivo o limitando la exposición con la bacteria. En el caso de *S. hominis* aún no se tienen reportes de cómo la composición de la biopelícula le favorezca para aumentar la resistencia a los antibióticos.

Se ha reportado en el medio ambiente, tanto terrestres como acuáticos, la contaminación de fármacos antimicrobianos (Berendonk *et al.*, 2015), sin embargo, las dosis en las que se encuentran son están por debajo de dosis terapéuticas. Así mismo, en el cuerpo humano puede suceder una situación similar al momento de un tratamiento antimicrobiano debido a una inadecuada medicación o en bajas dosis utilizadas como profilácticas (Goneau *et al.*, 2015). Por lo tanto, las bacterias crecen en presencia de concentraciones subinhibitorias de antibióticos los cuales pueden alterar las características metabólicas, alterando genes. Si bien las concentraciones subinhibitorias generalmente no interfieren con el crecimiento bacteriano, los microorganismos están sujetos a estrés. En este trabajo, se determinó el efecto de concentraciones subinhibitorias sobre la producción y composición de la biopelícula de *S. hominis*. En cuanto al nivel de formación de

biopelícula con subCMI, hubo diferencias entre los tres aislamientos, con cada antibiótico y cada concentración utilizada, sin embargo, en al menos una concentración de cada antibiótico se observó un aumento significativo en la producción de biopelícula (figura 4). Estos resultados sugieren que la bacteria al estar en contacto con una baja concentración de antibiótico, al contrario de eliminarla, busca la manera de protegerse al potenciar la formación de biopelícula. Por el contrario, al utilizar subCMEB se observó una disminución significativa de la formación de biopelícula con una concentración de linezolid, vancomicina, levofloxacina y trimetoprima (figura 5) y únicamente con 16 µg/mL de oxacilina se observó el efecto contrario al aumentar la formación de biopelícula. Al tratarse de una biopelícula establecida y madura, la mayoría de las concentraciones de antibióticos no surgen un efecto favorable para su erradicación, son muy pocos las concentraciones y los antibióticos que pudieron reducir la biopelícula. Cabe destacar que en el estado metabólico en el que se encuentra la bacteria, incluso el tiempo de maduración, tamaño de la molécula, etc. pudieran interferir en un efecto favorable. La composición de la biopelícula se vio principalmente afectada con subCMEB al cambiar la proporción de los tres componentes. Cabe destacar que el efecto fue nuevamente dependiendo del aislamiento, antibiótico y concentración. Así en el aislamiento 17-1211 (figura 8) la composición se vio afectada principalmente en carbohidratos y ADN extracelular, por el contrario, en el aislamiento 17-1523 los componentes principalmente afectados fueron proteínas y carbohidratos, en ambos casos disminuyendo la proporción. Por el contrario, al ya establecerse una biopelícula, el subCMEB tuvo menor efecto al modificar la proporción de los componentes, aunque de igual forma los carbohidratos disminuyeron en proporción. Estos resultados, al igual que reportes previos, indican que no hay un patrón específico y que existe alta variabilidad entre aislamientos, antibióticos y distintas concentraciones. Investigaciones previas demuestran que concentraciones subinhibitorias de antibióticos modifican la expresión de genes de virulencia de *S. aureus*, como las toxinas, las enzimas, las proteínas reguladoras, la adhesión, entre otras (Lázaro-Díez *et al.*, 2016; M. P. Otto *et al.*, 2013). En una investigación realizada por Szczuka y colaboradores, se observó el efecto de concentraciones subinhibitorias de tigeciclina y ciprofloxacino sobre la formación de biopelícula y genes asociados (*icaA*, *altE* y *sigB*) en *S. epidermidis* obteniendo distintos resultados. En la mayoría de las cepas estudiadas la

expresión de los genes se incrementó después de la exposición a 0.25 y 0.50 del CMI con tigeciclina. Mientras que el efecto del ciprofloxacino sobre la expresión de los genes fue dependiente del aislamiento. En cuanto a la producción de la biopelícula, el ciprofloxacino lo disminuyó y la tigeciclina estimuló el proceso (Rosman *et al.*, 2021; Szczuka *et al.*, 2017). Una investigación realizada por Kaplan y colaboradores en el 2011 reportaron que concentraciones subinhibitorias de vancomicina modificaban la composición de la biopelícula en ciertos aislamientos de *S. epidermidis*, el efecto era dependiente del aislamiento, podría aumentar la producción de poli-*N*-acetilglucosamina o ADN extracelular en presencia del antibiótico. Este estudio concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación referente a que subóptimas de antibióticos modifican la composición de la biopelícula.

Para realizar un análisis visual y comparar los resultados con los ensayos de desprendimiento, se utilizó microscopia de fluorescencia para determinar el efecto de subCMI y subCMEB. En la figura 11 se observa el efecto subCMI sobre la biopelícula de *S. hominis*. Se muestra una biopelícula densa en el control sin antibióticos del aislamiento 17-1211, observando esta proporción heterogénea de los componentes de la biopelícula. La variación entre cada antibiótico con distintas concentraciones se puede apreciar claramente. Es evidente que subCMI afectan en la proporción de los componentes, tal es el caso de linezolid en donde se aprecia una disminución en la formación de biopelículas un cambio en la proporción de los componentes, disminuyendo carbohidratos y aumentando proteínas. Por el contrario, con subCMI de oxacilina se aprecia una biopelícula abundante en carbohidratos y poca proporción de proteínas. En cuanto a la composición, se aprecia el mismo panorama en el cual hay un cambio en la proporción de los componentes viéndose afectados principalmente carbohidratos y proteínas (figura 12) y ésta a su vez depende del antibiótico de la concentración. En cuanto a la biopelícula con subCMEB se observa un panorama distinto, las concentraciones subinhibitorias, así como los distintos antibióticos disminuyen la formación de la biopelícula y nuevamente el efecto de cada antibiótico es individual para los componentes. Como se observa en la figura 13, el control de la biopelícula a las 48 h muestra una disminución en los carbohidratos y aumento en las proteínas a comparación de las 24 h en donde se aprecia una proporción similar de estos componentes. Una concentración subCMEB de linezolid y oxacilina

muestran mayor proporción de carbohidratos y menor de proteínas, concentraciones subCMEB trimetoprima y vancomicina disminuyen la proporción de carbohidratos y aumentan las proteínas.

9. CONCLUSIONES

A pesar de que *S. hominis* subsp *novobiosepticus* es reportada como la especie más virulenta, su frecuencia de aislamiento es muy baja, predominando *S. hominis* subsp. *hominis*.

Aislamientos clínicos de *S. hominis* muestran altos porcentajes de formación de biopelícula, dentro de éstos destacando mayor proporción de aislamientos productores.

El monitoreo de la resistencia a antibióticos es relevante debido a la fácil adquisición de genes de resistencia, destacando antibióticos como linezolid, antibiótico clasificado como uno de los de último recurso.

La producción de biopelícula de aislamientos clínicos de *S. hominis* potencian la resistencia a la mayoría de los antibióticos probados, destacando su importancia como un factor de virulencia importante en esta bacteria.

El efecto de concentraciones subinibitorias de antibióticos se ve afectado de manera diferente tanto antes de que la bacteria forme la biopelícula (subCMI) como ya formada (subCMEB).

No se ha establecido un patrón específico del efecto de subCMI o subCMEB en cuanto a la formación y composición de la biopelícula de *S. hominis*, dependiendo del aislamiento, antibiótico y concentración.

Elucidar los mecanismos implicados en la resistencia a los antibióticos relacionados a la formación de biopelícula, así como el efecto de dosis sub terapéuticas antes y después de que se forme la biopelícula es un punto clave para entender y desarrollar estrategias para su control y erradicación en las infecciones.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la capacidad de formación de biopelícula de *S. hominis* en distintas superficies.
- Determinar la composición de la biopelícula en distintas superficies.
- Evaluar el efecto de concentraciones subinhibitorias de distintos antibióticos en la formación de biopelícula en distintos tiempos con y sin subCMI y subCMEB.
- Comparar la composición de la biopelícula de aislamientos clínicos vs. aislamientos comensales.
- Realizar la extracción de la biopelícula y cuantificar sus componentes individuales con y sin subCMI y subCMEB.
- Buscar y validar picos del perfil proteico como marcadores moleculares enfocados a la formación de biopelícula, presencia de genes y la resistencia a antibióticos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*, *146*(3713), 837-837. doi:10.1038/146837a0
- Ahmed, N. H., Baruah, F. K., & Grover, R. K. (2017). Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus, an emerging multidrug-resistant bacterium, as a causative agent of septicaemia in cancer patients. *Indian J Med Res*, *146*(3), 420-425. doi:10.4103/ijmr.IJMR_1362_15
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaoli, S., & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, *5*, 7. doi:10.3389/fcimb.2015.00007
- Arciola, C. R., Gamberini, S., Campoccia, D., Visai, L., Speziale, P., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2005). A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in Staphylococcus epidermidis. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *75A*(2), 408-413. doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30445>
- Aykut, A., Sevik, M. O., Şan, B., & Şahin, Ö. (2022). Staphylococcus hominis: a rare cause of endophthalmitis. *Arq Bras Oftalmol*. doi:10.5935/0004-2749.20230035
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., . . . Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(3), 313-351. doi:10.1080/1040841X.2016.1208146
- Barbier, F., Ruppé, E., Hernandez, D., Lebeaux, D., Francois, P., Felix, B., . . . Ruimy, R. (2010). Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between Staphylococcus epidermidis and major clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Infect Dis*, *202*(2), 270-281. doi:10.1086/653483
- Bayles, K. W. (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(9), 721-726. doi:10.1038/nrmicro1743
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, *27*(4), 870-926. doi:10.1128/cmr.00109-13
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., . . . Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 310-317. doi:10.1038/nrmicro3439
- Bouchami, O., Ben Hassen, A., de Lencastre, H., & Miragaia, M. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus hominis (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements. *Plos One*, *6*(7), e21940. doi:10.1371/journal.pone.0021940
- Brazeau, N. F., Levinson, K. J., Schranz, A., Moser, K. A., Hollis, I., Iyer, P., . . . Bartelt, L. A. (2020). Loss of daptomycin susceptibility in clinical Staphylococcus epidermidis infection coincided with variants in Walk. *Evolution, Medicine, and Public Health*, *2020*(1), 219-224. doi:10.1093/emph/eoaa031
- Casey, A. L., Lambert, P. A., & Elliott, T. S. J. (2007). Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *29*, S23-S32. doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)72175-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)72175-1)

- Çetin, E. T., & Ang, Ö. (1962). Staphylococci Resistant to Methicillin ("Celbenin"). *Br Med J*, 2(5296), 51-52.
- CLSI. (2018). Methods for Dilution Antimicrobial Suceptibility That Grow Aerobically. M07. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2022). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cong, Y., Yang, S., & Rao, X. (2020). Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res*, 21, 169-176. doi:10.1016/j.jare.2019.10.005
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 67(10), 5427-5433. doi:10.1128/iai.67.10.5427-5433.1999
- Crosby, H. A., Kwiecinski, J., & Horswill, A. R. (2016). Staphylococcus aureus Aggregation and Coagulation Mechanisms, and Their Function in Host-Pathogen Interactions. *Adv Appl Microbiol*, 96, 1-41. doi:10.1016/bs.aambs.2016.07.018
- Chamon, R. C., Iorio, N. L. P., Cavalcante, F. S., Teodoro, C. R. S., de Oliveira, A. P. C., Maia, F., & dos Santos, K. R. N. (2014). Linezolid-resistant Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus hominis: single and double mutations at the domain V of 23S rRNA among isolates from a Rio de Janeiro hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(4), 307-310. doi:<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.011>
- Chaves, F., García-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C., & Otero, J. R. (2005a). Nosocomial spread of a Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 43(9), 4877-4879. doi:10.1128/jcm.43.9.4877-4879.2005
- Chaves, F., Garcia-Alvarez, N., Sanz, F., Alba, C., & Otero, J. R. (2005b). Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4877-4879. doi:10.1128/jcm.43.9.4877-4879.2005
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (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. doi:10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985
- d'Azevedo, P. A., Trancesi, R., Sales, T., Monteiro, J., Gales, A. C., & Pignatari, A. C. (2008). Outbreak of Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus bloodstream infections in São Paulo city, Brazil. *J Med Microbiol*, 57(Pt 2), 256-257. doi:10.1099/jmm.0.47345-0
- de Almeida, L. M., de Araújo, M. R., Sacramento, A. G., Pavez, M., de Souza, A. G., Rodrigues, F., . . . Mamizuka, E. M. (2013). Linezolid resistance in Brazilian Staphylococcus hominis strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(8), 4082-4083. doi:10.1128/aac.00437-13
- de Almeida, L. M., de Araújo, M. R. E., Sacramento, A. G., Pavez, M., de Souza, A. G., Rodrigues, F., . . . Mamizuka, E. M. (2013). Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal

- mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8), 4082-4083. doi:10.1128/AAC.00437-13
- de Allori, M. C., Jure, M. A., Romero, C., & de Castillo, M. E. (2006). Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative Staphylococcus strains. *Biol Pharm Bull*, 29(8), 1592-1596. doi:10.1248/bpb.29.1592
- De Vecchi, E., George, D. A., Romanò, C. L., Pregliasco, F. E., Mattina, R., & Drago, L. (2018). Antibiotic sensitivities of coagulase-negative staphylococci and Staphylococcus aureus in hip and knee periprosthetic joint infections: does this differ if patients meet the International Consensus Meeting Criteria? *Infect Drug Resist*, 11, 539-546. doi:10.2147/idr.s151271
- Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N., & Beach, M. (2001). Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, 32 Suppl 2, S114-132. doi:10.1086/320184
- Elbehiry, A., Al-Dubaib, M., Marzouk, E., Osman, S., & Edrees, H. (2016). Performance of MALDI biotyper compared with Vitek(™) 2 compact system for fast identification and discrimination of Staphylococcus species isolated from bovine mastitis. *Microbiologyopen*, 5(6), 1061-1070. doi:10.1002/mbo3.389
- França, A., Gaio, V., Lopes, N., & Melo, L. D. R. (2021). Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens*, 10(2). doi:10.3390/pathogens10020170
- Frank, K. L., & Patel, R. (2007). Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive Staphylococcus lugdunensis isolates. *Infect Immun*, 75(10), 4728-4742. doi:10.1128/iai.00640-07
- Fuchs, P. C., Barry, A. L., & Brown, S. D. (2000). Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38(1), 51-58. doi:[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00164-4)
- Garza-González, E., Morfin-Otero, R., Martínez-Vázquez, M. A., Gonzalez-Diaz, E., González-Santiago, O., & Rodríguez-Noriega, E. (2011). Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of Staphylococcus cohnii, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus sciuri. *Scand J Infect Dis*, 43(11-12), 930-936. doi:10.3109/00365548.2011.598873
- Girard, L. P., Ceri, H., Gibb, A. P., Olson, M., & Sepandj, F. (2010). MIC versus MBEC to Determine the Antibiotic Sensitivity of Staphylococcus aureus in Peritoneal Dialysis Peritonitis. *Peritoneal Dialysis International*, 30(6), 652-656. doi:10.3747/pdi.2010.00010
- Goneau, L. W., Hannan, T. J., MacPhee, R. A., Schwartz, D. J., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., . . . Burton, J. P. (2015). Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *mBio*, 6(2). doi:10.1128/mBio.00356-15
- Gostev, V., Leyn, S., Kruglov, A., Likholetova, D., Kalinogorskaya, O., Baykina, M., . . . Sidorenko, S. (2021). Global Expansion of Linezolid-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci. *Front Microbiol*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.661798

- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 107. doi:10.3389/fcimb.2020.00107
- Haddadin, R. N., Saleh, S., Al-Adham, I. S., Buultjens, T. E., & Collier, P. J. (2010). The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Appl Microbiol*, *108*(4), 1281-1291. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04529.x
- Heilmann, C., Ziebuhr, W., & Becker, K. (2019). Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(9), 1071-1080. doi:10.1016/j.cmi.2018.11.012
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., & Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, *74*(2), 470-476. doi:10.1128/aem.02073-07
- Kehrenberg, C., & Schwarz, S. (2006). Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cf*r among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(4), 1156-1163. doi:10.1128/aac.50.4.1156-1163.2006
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L. H., & Vester, B. (2005). A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular Microbiology*, *57*(4), 1064-1073. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x>
- Kirby, A. E., Garner, K., & Levin, B. R. (2012). The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, *56*(6), 2967-2975. doi:10.1128/aac.06480-11
- Kloos, W. E., & Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, *7*(1), 117-140. doi:10.1128/cmr.7.1.117
- Kloos, W. E., George, C. G., Olgiate, J. S., Van Pelt, L., McKinnon, M. L., Zimmer, B. L., . . . Mirrett, S. (1998). *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *48*(3), 799-812. doi:<https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-799>
- Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* 1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *25*(1), 62-79. doi:<https://doi.org/10.1099/00207713-25-1-62>
- Kosecka-Strojek, M., Sadowy, E., Gawryszewska, I., Klepacka, J., Tomasik, T., Michalik, M., . . . Miedzobrodzki, J. (2020). Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in the tertiary children's hospital in Cracow, Poland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *39*(9), 1717-1725. doi:10.1007/s10096-020-03893-w
- Lázaro-Díez, M., Remuzgo-Martínez, S., Rodríguez-Mirones, C., Acosta, F., Icardo, J. M., Martínez-Martínez, L., & Ramos-Vivas, J. (2016). Effects of Subinhibitory Concentrations of Ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilms. *Plos One*, *11*(1), e0147569. doi:10.1371/journal.pone.0147569

- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 78(3), 510-543. doi:10.1128/mnbr.00013-14
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr*, 3(3). doi:10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014
- Loncaric, I., Küber-Heiss, A., Posautz, A., Ruppitsch, W., Lepuschitz, S., Schauer, B., . . . Spersger, J. (2019). Characterization of mecC gene-carrying coagulase-negative Staphylococcus spp. isolated from various animals. *Veterinary Microbiology*, 230, 138-144. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.014>
- Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., & Laufs, R. (1994). Characterization of transposon mutants of biofilm-producing Staphylococcus epidermidis impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun*, 62(8), 3244-3253. doi:10.1128/iai.62.8.3244-3253.1994
- Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 7(9), 1061-1072. doi:10.2217/fmb.12.76
- Maira-Litrán, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., 3rd, Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun*, 70(8), 4433-4440. doi:10.1128/iai.70.8.4433-4440.2002
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Flores-Trevino, S., González-González, G. M., . . . Garza-González, E. (2013). Microbiological and Molecular Characterization of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS One*, 8(4), 6. doi:10.1371/journal.pone.0061161
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Flores-Treviño, S., González-González, G. M., . . . Garza-González, E. (2013). Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *Plos One*, 8(4), e61161. doi:10.1371/journal.pone.0061161
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Villarreal-Trevino, L., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Camacho-Ortiz, A., . . . Garza-González, E. (2015). Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS One*, 10(12), e0144684. doi:10.1371/journal.pone.0144684
- Michels, R., Last, K., Becker, S. L., & Papan, C. (2021). Update on Coagulase-Negative Staphylococci-What the Clinician Should Know. *Microorganisms*, 9(4). doi:10.3390/microorganisms9040830
- Missineo, A., Di Poto, A., Geoghegan, J. A., Rindi, S., Heilbronner, S., Gianotti, V., . . . Pietrocola, G. (2014). IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* induces biofilm formation under low-iron growth conditions. *Infect Immun*, 82(6), 2448-2459. doi:10.1128/iai.01542-14
- Mittal, G., Bhandari, V., Gaiind, R., Rani, V., Chopra, S., Dawar, R., . . . Verma, P. K. (2019). Linezolid resistant coagulase negative staphylococci (LRCoNS) with novel mutations causing blood stream infections (BSI) in India. *BMC Infect Dis*, 19(1), 717. doi:10.1186/s12879-019-4368-6

- Morales, G., Picazo, J. J., Baos, E., Candel, F. J., Arribi, A., Peláez, B., . . . Sánchez-García, M. (2010). Resistance to Linezolid Is Mediated by the cfr Gene in the First Report of an Outbreak of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 821-825. doi:10.1086/650574
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., . . . Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00928
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Nishikawa, M., & Kobayashi, K. (2021). Calcium Prevents Biofilm Dispersion in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 203(14), e0011421. doi:10.1128/jb.00114-21
- OMS. (2022). Resistencia a los antibióticos. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Otto, M. (2010). *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*, 5(2), 183-195. doi:10.1586/edm.10.6
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., . . . Dumitrescu, O. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 68(7), 1524-1532. doi:10.1093/jac/dkt073
- Panda, S., & Singh, D. V. (2018). Biofilm Formation by ica-Negative Ocular Isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front Microbiol*, 9, 2687. doi:10.3389/fmicb.2018.02687
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., & Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*, 64(Pt 4), 323-334. doi:10.1099/jmm.0.000032
- Pereira, E. M., de Mattos, C. S., dos Santos, O. C., Ferreira, D. C., de Oliveira, T. L. R., Laport, M. S., . . . dos Santos, K. R. N. (2019). *Staphylococcus hominis* subspecies can be identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS profiles. *Scientific Reports*, 9(1), 11736. doi:10.1038/s41598-019-48248-4
- Peters, G., Locci, R., & Pulverer, G. (1982). Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis*, 146(4), 479-482. doi:10.1093/infdis/146.4.479
- Pisetsky, D. S. (2017). The biological functions of DNA: from the sublime to the slime. *Arthritis Research & Therapy*, 19(1), 275. doi:10.1186/s13075-017-1464-0
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., & Qu, D. (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading)*, 153(Pt 7), 2083-2092. doi:10.1099/mic.0.2007/006031-0
- Qu, Y., Daley, A. J., Istivan, T. S., Garland, S. M., & Deighton, M. A. (2010). Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 9, 16. doi:10.1186/1476-0711-9-16
- Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., Pietrocola, G., Zatorska, B., Maso, A., . . . Arciola, C. R. (2020). Various biofilm matrices of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis*: exopolysaccharides, proteins, eDNA and their

- correlation with biofilm mass. *Biofouling*, 36(1), 86-100. doi:10.1080/08927014.2020.1716217
- Rey, J., Gil, M., de Mendoza, J. H., García, A., Gaitskell-Phillips, G., Bastidas-Caldes, C., & Zalama, L. (2022). Clonality and Persistence of Multiresistant Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from the Staff of a University Veterinary Hospital. *Antibiotics (Basel)*, 11(6). doi:10.3390/antibiotics11060811
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 4(3), 482-501. doi:10.3934/microbiol.2018.3.482
- Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., . . . Mack, D. (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28(9), 1711-1720. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.046
- Rohde, H., Mack, D., Christner, M., Burdelski, C., Franke, G., & Knobloch, J. K.-M. (2006). Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 17(2), 45-54. doi:10.1097/01.revmedmi.0000244134.43170.83
- Rosman, C. W. K., van der Mei, H. C., & Sjollem, J. (2021). Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobials on micrococcal nuclease and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 11(1), 13241. doi:10.1038/s41598-021-92619-9
- Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y. F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D. B., . . . Pier, G. B. (2015). Identification of Poly-N-acetylglucosamine as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus subtilis* Biofilm Matrix. *J Biol Chem*, 290(31), 19261-19272. doi:10.1074/jbc.M115.648709
- Roy, P., Ahmed, N. H., Biswal, I., & Grover, R. K. (2014). Multidrug-resistant *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* causing septicemia in patients with malignancy. *Indian J Pathol Microbiol*, 57(2), 275-277. doi:10.4103/0377-4929.134708
- Ruiz-Giardín, J. M., Ochoa Chamorro, I., Velázquez Ríos, L., Jaqueti Aroca, J., García Arata, M. I., SanMartín López, J. V., & Guerrero Santillán, M. (2019). Blood stream infections associated with central and peripheral venous catheters. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 841. doi:10.1186/s12879-019-4505-2
- Ruiz de Gopegui, E., Iuliana Marinescu, C., Díaz, P., Socías, A., Garau, M., Ayestarán, J. I., . . . Oliver, A. (2011). [Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(5), 339-344. doi:10.1016/j.eimc.2011.02.001
- Saber, H., Jasni, A. S., Jamaluddin, T., & Ibrahim, R. (2017). A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Types in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Species. *Malays J Med Sci*, 24(5), 7-18. doi:10.21315/mjms2017.24.5.2
- Sarkisova, S., Patrauchan, M. A., Berglund, D., Nivens, D. E., & Franklin, M. J. (2005). Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*, 187(13), 4327-4337. doi:10.1128/jb.187.13.4327-4337.2005

- Schleifer, K.-H., & Bell, J. A. *Staphylococcus Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-43).
- Schulin, T., & Voss, A. (2001). Coagulase-negative staphylococci as a cause of infections related to intravascular prosthetic devices: limitations of present therapy. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 1-7. doi:10.1046/j.1469-0691.2001.00053.x
- Severn, M. M., Williams, M. R., Shahbandi, A., Bunch, Z. L., Lyon, L. M., Nguyen, A., . . . Horswill, A. R. (2022). The Ubiquitous Human Skin Commensal *Staphylococcus hominis* Protects against Opportunistic Pathogens. *mBio*, 13(3), e0093022. doi:10.1128/mbio.00930-22
- Shariati, A., Dadashi, M., Moghadam, M. T., van Belkum, A., Yaslianifard, S., & Darban-Sarokhalil, D. (2020). Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 12689. doi:10.1038/s41598-020-69058-z
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 76. doi:10.1186/s13756-019-0533-3
- Sharma, V., Jindal, N., & Devi, P. (2010). Prevalence of methicillin resistant coagulase negative staphylococci in a tertiary care hospital. *Iran J Microbiol*, 2(4), 185-188.
- Singh, A. K., Prakash, P., Achra, A., Singh, G. P., Das, A., & Singh, R. K. (2017). Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis*, 9(3), 93-101. doi:10.4103/jgid.jgid_91_16
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J*, 11, 53-62. doi:10.2174/1874285801711010053
- Skander Hathroubi, M. A. M., Philip Domenico, Dao Nguyen, and Mario Jacques. (2017). Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, 23(2), 147-156. doi:10.1089/mdr.2016.0087
- Smith, I. M., Beals, P. D., Kingsbury, K. R., & Hasenclever, H. F. (1958). Observations on *Staphylococcus albus* septicemia in mice and men. *AMA Arch Intern Med*, 102(3), 375-388. doi:10.1001/archinte.1958.00030010375005
- Sorlozano, A., Gutierrez, J., Martinez, T., Yuste, M. E., Perez-Lopez, J. A., Vindel, A., . . . Boquete, T. (2010). Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29(1), 73-80. doi:10.1007/s10096-009-0823-4
- Sorosh, S., Jabalameli, F., Taherikalani, M., Eslampour, M. A., Beigverdi, R., & Emaneini, M. (2017). Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome mec analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from blood cultures of children. *Rev Soc Bras Med Trop*, 50(3), 329-333. doi:10.1590/0037-8682-0384-2016
- Stoitsova, S. R., Paunova-Krasteva, T. S., Borisova, D. B. (2016). Modulation of Biofilm Growth by Sub-Inhibitory Amounts of Antibacterial Substances. In D. Dhanasekaran, Thajuddin, N. (Ed.), *Microbial Biofilms - Importance and Applications* IntechOpen.

- Szczuka, E., Jabłońska, L., & Kaznowski, A. (2017). Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading)*, *163*(5), 712-718. doi:10.1099/mic.0.000453
- Szczuka, E., Krzysińska, S., Bogucka, N., & Kaznowski, A. (2018). Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *111*(7), 1259-1265. doi:10.1007/s10482-017-1007-3
- Szczuka, E., Makowska, N., Bosacka, K., Słotwińska, A., & Kaznowski, A. (2016). Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)*, *61*(2), 143-147. doi:10.1007/s12223-015-0419-6
- Szczuka, E., Telega, K., & Kaznowski, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)*, *60*(1), 1-5. doi:10.1007/s12223-014-0332-4
- Szemraj, M., Grazul, M., Balcerczak, E., & Szewczyk, E. M. (2020). Staphylococcal species less frequently isolated from human clinical specimens - are they a threat for hospital patients? *BMC Infect Dis*, *20*(1), 128. doi:10.1186/s12879-020-4841-2
- Tang, H. J., Chen, C. C., Cheng, K. C., Wu, K. Y., Lin, Y. C., Zhang, C. C., . . . Chuang, Y. C. (2013). In vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, *57*(11), 5717-5720. doi:10.1128/aac.01236-13
- Tischler, A. H., Lie, L., Thompson, C. M., & Visick, K. L. (2018). Discovery of Calcium as a Biofilm-Promoting Signal for *Vibrio fischeri* Reveals New Phenotypes and Underlying Regulatory Complexity. *J Bacteriol*, *200*(15). doi:10.1128/jb.00016-18
- Uehara, Y. (2022). Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). *Antibiotics (Basel)*, *11*(1). doi:10.3390/antibiotics11010086
- Wang, S., Breslawec, A. P., Alvarez, E., Tyrlik, M., Li, C., & Poulin, M. B. (2019). Differential Recognition of Deacetylated PNAG Oligosaccharides by a Biofilm Degrading Glycosidase. *ACS Chemical Biology*, *14*(9), 1998-2005. doi:10.1021/acscchembio.9b00467
- Wesley E. Kloos, C. G. G., Jennifer S. Olgiate, Linda Van Pelt, Mary L. McKinnon, Barbara L. Zimmer, Eugene Muller, Melvin P. Weinstein and Stanley Mirrett. (1998). *Staphylococcus horninis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and *N*-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*, 799-812. doi:10.1099/00207713-48-3-799
- Zhanel, G. G., Hoban, D. J., & Harding, G. K. (1992). Subinhibitory antimicrobial concentrations: A review of in vitro and in vivo data. *Can J Infect Dis*, *3*(4), 193-201. doi:10.1155/1992/793607
- Zheng, Y., He, L., Asiamah, T. K., & Otto, M. (2018). Colonization of medical devices by staphylococci. *Environ Microbiol*, *20*(9), 3141-3153. doi:10.1111/1462-2920.14129

- Zhu, W., Sieradzki, K., Albrecht, V., McAllister, S., Lin, W., Stuchlik, O., . . . Kamile Rasheed, J. (2015). Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of Staphylococcus species. *Journal of Microbiological Methods*, 117, 14-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.07.014>
- Zimmerli, W., & Sendi, P. (2019). Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections In Vitro, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(2). doi:10.1128/aac.01746-18

12. ANEXOS



Improvement of antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing coagulase-negative *Staphylococcus hominis*

Verónica Villarreal-Salazar^a, Paola Bocanegra-Ibarias^b, Licet Villarreal-Treviño^a, Daniel Salas-Treviño^b, Rayo Morfin-Otero^c, Adrián Camacho-Ortiz^b, Samantha Flores-Treviño^{b,*}

^a Department of Microbiology, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450, Mexico

^b Department of Infectious Diseases, Hospital Universitario "Dr. José E. González" y Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León CP 64460, Mexico

^c Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde, Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

MBEC
MIC
Biofilm
Calgary device
Planktonic
subMIC

ABSTRACT

Coagulase-negative *Staphylococcus hominis* causes bloodstream infections and often can form biofilms on medical devices. This study aimed to improve the current methodology for antimicrobial susceptibility testing (AST) in biofilm-growing *S. hominis* isolates. Biofilm production of *S. hominis* was assessed using the crystal violet staining method in trypticase soy broth supplemented with 1% glucose (TSB_{glu1%}), Mueller-Hinton broth (MHB), or MHB_{glu1%} using flat-bottom plates or the Calgary device. Susceptibility to antibiotics was assessed using the broth microdilution method (MHB and TSB_{glu1%}) in planktonic cells (round-bottom plates) and biofilm cells (flat-bottom plates and the Calgary device). Biofilm determination using TSB_{glu1%} yielded better performance over MHB, and flat-bottom plates without agitation were preferred over the Calgary device. Higher fold dilution values between the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) and the minimum inhibitory concentration (MIC) were obtained in MHB for almost all antibiotics, except for linezolid. TSB_{glu1%} and flat-bottom polystyrene plates were preferred over MHB and the Calgary device for biofilm determination. AST in biofilm-growing *S. hominis* showed better performance using TSB_{glu1%} compared to MHB. Therefore, when comparing MBEC and MIC values, AST in planktonic cells could also be performed using TSB_{glu1%} instead of MHB.

1. Introduction

The coagulase-negative staphylococci (CoNS) group consists of more than 50 species (Becker et al., 2020; Michels et al., 2021). Clinically relevant members of the CoNS group are *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus lugdunensis* (Frickmann et al., 2018; Michels et al., 2021), which are increasingly reported as being pathogens causative of healthcare-associated infections, causing skin and soft tissue or bloodstream infections (Chaves et al., 2005; Lisowska-Lysiak et al., 2021). CoNS most affects immunocompromised patients or those implanted with foreign body devices (Becker et al., 2020). Some CoNS have the ability to form biofilms on medical devices which can protect them against the effect of antibiotics (Kranjec

et al., 2021). Biofilms are bacterial communities embedded in an extracellular polymeric matrix (EPS), which is composed of extracellular exopolysaccharides i.e., polysaccharide intercellular adhesin (PIA), β -1,6-linked poly-N-acetylglucosamine (PNAG), teichoic acids, proteins, and extracellular DNA (eDNA) (Franca et al., 2021; Kranjec et al., 2021). These components protect the host immune system and decrease the effectiveness of the antibiotics (Becker et al., 2020; Costerton et al., 1999; Franca et al., 2021; Kranjec et al., 2021; Mendoza-Olazarán et al., 2015).

The incidence of *S. hominis* causative agent of bloodstream infections has increased.

(Chaves et al., 2005; Mendoza-Olazarán et al., 2015). The treatment of infections caused by *S. hominis* is often complicated due to the emergence of drug-resistant strains (Szczuka et al., 2018; Szemraj et al.,

* Corresponding author at: Department of Infectious Diseases, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Madero S/N esq Ave Gonzalitos, Mitras Centro, 664600 Monterrey, NL, Mexico.

E-mail address: samantha.florestr@uanl.edu.mx (S. Flores-Treviño).

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106493>

Received 16 March 2022; Received in revised form 20 May 2022; Accepted 21 May 2022

Available online 25 May 2022

0167-7012/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

2020) in addition to strong biofilm production (Mendoza-Olazarán et al., 2015; Szczuka et al., 2015). In infections with biofilm-producing strains, the response to conventional antibiotics is poor and the treatment is difficult. Therapy options are limited to the removal of the implanted device or a combination of antibiotics, and prolonged antibiotic administration (Becker et al., 2020). Clinical treatment is based on antibiotic susceptibility data from current laboratory methods, which measure minimum inhibitory concentrations (MIC) of the antibiotic on bacteria in its planktonic form, instead of in its sessile form, i.e. biofilm cells (Macia et al., 2014). However, infections caused by biofilm-forming bacteria tend to persist and require higher doses of antibiotics or prolonged treatment administration compared to data revealed by planktonic susceptibility data (Macia et al., 2014; Song et al., 2016).

Current antimicrobial susceptibility methods need to be improved to better evaluate the effect of a specific antibiotic on the bacteria in its biofilm-forming state. Most used in vitro biofilm models evaluating antimicrobial susceptibility testing utilize the microtiter plate-based assay and the Calgary biofilm device (Ceri et al., 1999; Costerton et al., 1999; Macia et al., 2014). The microtiter plate contains 96 wells in which bacteria in broth culture is incubated to form biofilms on the wall and/or bottom of the well. The wells are rinsed to remove planktonic cells and exposed to serial dilutions of antibiotics. After incubation, the wells are washed to remove non-adherent biofilm, and then fresh broth is added, and incubated. Finally, the minimal biofilm-eradication concentration (MBEC) is measured. Thus, MBEC is used to measure the effect of antibiotics on biofilms (Macia et al., 2014). The Calgary biofilm device is also a 96-well plate with pegs protruding on its lid, on which bacterial biofilms can grow after broth incubation. The pegs containing biofilm cells are exposed to varying concentrations of antibiotics. Afterwards, the remaining biofilm cells are recovered by sonication in fresh broth. After incubation, the MBEC is determined (Ceri et al., 1999; Macia et al., 2014). Several modifications and methodologies are used to determine antimicrobial susceptibility in *Staphylococcus* spp. (Cerca et al., 2005; Esteban et al., 2010; Martins et al., 2019a, 2019b, Oliveira and Cunha Mde, 2010), though no consensus is made, especially in CoNS. Therefore, in the present study, we aimed to improve the current methodology for antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing *S. hominis* isolates.

2. Materials and methods

2.1. Culture and identification of *S. hominis* isolates

Eleven clinical isolates of *S. hominis* were collected from blood cultures between July 2017 and March 2018 at the Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” and Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, a third-level hospitals in Jalisco and Nuevo Leon, Mexico, respectively. Bacteria were grown on plates containing trypticase soy agar (BD Bioxon, HDB, Germany) with 5% sheep blood and incubated overnight at 37 °C. All *S. hominis* isolates were stored at -70 °C in trypticase soy broth (TSB) with 15% glycerol until further use. *S. hominis* ATCC 27844 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as the reference strain for biofilm non-producer and producer, respectively (Martins et al., 2019a, 2019b; Mendoza-Olazarán et al., 2015).

Isolates were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Microflex LT system, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) according to the manufacturer's recommendations. A colony from a 24 h culture grown on blood agar (BD Bioxon, HDB, Germany) at 37 °C under aerobic conditions was transferred with a wooden toothpick directly onto a 96-spot stainless steel target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Following air-drying, 1 µL of 70% formic acid was added, air-dried again, and samples were overlaid with 1 µL of the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico). The target plate was introduced into the equipment and was analyzed by MALDI

Biotyper 3.1 software for spectra profile matching in the database. The isolates were classified according to the manufacturer's recommended score identification criteria, in which a score within the 2.0–3.0 range indicates reliable species-level identification (Bruker, 2011).

2.2. Comparison of biofilm and antimicrobial susceptibility testing methodologies in biofilm cells

The determination of biofilm production was assessed using and comparing the results of two methodologies, using either flat-bottom plates (with and without agitation) or the Calgary device in addition to three different media, trypticase soy broth (BD Bacto, HDB, Germany) supplemented with 1% glucose (TSB_{glu1%}), Mueller-Hinton broth (MHB) (BD Difco, MD, USA), or MHB_{glu1%}. The determination of antimicrobial susceptibility testing (AST) was assessed in planktonic cells using the broth microdilution method in round-bottom plates in addition to two different media (MHB and TSB_{glu1%}). AST in biofilm cells was also assessed by comparing the use of flat-bottom plates (and two different media, MHB and TSB_{glu1%}) and the Calgary device (using MHB). Then, subinhibitory concentrations of antibiotics were added to pre-formed biofilms in flat-bottom plates and two different media (MHB and TSB_{glu1%}).

2.3. Biofilm production determination

2.3.1. Flat-bottom plates

Biofilm production was semi-quantitatively determined using the crystal violet staining method (Christensen et al., 1985) with minor modifications and using three different media. Overnight plate cultures were adjusted to 0.5 McFarland standard in sterile saline solution and diluted 1:100 in either trypticase soy broth supplemented with 1% glucose (TSB_{glu1%}), Mueller-Hinton broth (MHB), or Mueller-Hinton broth supplemented with 1% glucose (MHB_{glu1%}). Next, 200 µL were transferred to each well on sterile polystyrene 96-well flat-bottom plates (Corning Inc., Corning, NY, USA). After 24 h incubation at 37 °C with or without agitation at 150 rpm, planktonic cells were discarded, and the biofilm was washed with phosphate-buffered saline (PBS) buffer pH 7. Then, the biofilm cells were fixed with methanol for 15 min, air dried and stained with crystal violet (0.1%) for 15 min. After washing the non-adherent crystal violet, the stained biofilm was dissolved with an ethanol-acetone mixture (7:3). The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm (OD₅₉₅) in a spectrophotometer (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). All isolates were tested in quadruplicate. Previous OD₅₉₅ cut-off values were used to classify the isolates as follows: OD₅₉₅ > 0.25, strong biofilm producers; 0.12 > OD₅₉₅ < 0.24, weak-biofilm producers; and OD₅₉₅ < 0.11, non-biofilm producers (Christensen et al., 1985). *S. hominis* strains included in the study were nine biofilm-producers, of which four were strong biofilm-producers and five weak biofilm-producers, and two non-biofilm producer strains.

2.3.2. Calgary device

Biofilm production determination using the MBEC assay's biofilm inoculator, also called the Calgary device (MEBC, Innovotech, AB, Canada), was performed according to the manufacturer's instructions. A bacterial inoculum of 0.5 McFarland was diluted 1:100 in either TSB_{glu1%}, MHB, or MHB_{glu1%}. Aliquots of 150 µL were transferred to the Calgary device, which is a 96-well flat bottom plate covered with a 96-pin lid to allow biofilm formation on the pins after incubation for 24 h at 37 °C with agitation at 150 rpm. After this period, the lid with the biofilms formed on the pins was washed in a new microtiter plate containing 200 µL of PBS buffer pH 7. Then, the lid was fixed with 200 µL of methanol for 15 min, air-dried, and stained with 200 µL crystal violet (0.1%) for 15 min. After washing the non-adherent crystal violet, the stained biofilm of the pins was dissolved and recovered in 200 µL of ethanol-acetone mixture (7:3). The OD₅₉₅ was measured in a

Table 1
Characteristics of *Staphylococcus* spp. clinical strains included in the study.

Isolate ¹	Species	Year	Specimen	Biofilm production ²	Antimicrobial susceptibility ³							
					LZD	TMP	VAN	LEV	OXA	DAP	RIF	
17-1211	<i>Staphylococcus hominis</i>	2017	Blood	Strong	R	R	S	R	R	S	S	
17-1214	<i>S. hominis</i>	2017	Blood	Weak	R	R	S	R	R	S	S	
17-1523	<i>S. hominis</i>	2017	Blood	Strong	R	R	S	R	R	S	S	
17-2108	<i>S. hominis</i>	2017	Blood	Weak	S	R	S	S	R	S	S	
18-0329	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	Strong	S	R	S	S	R	S	S	
18-0445	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	Strong	S	R	S	S	R	S	S	
18-1018	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	Weak	S	R	S	R	R	S	S	
18-1031	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	Weak	S	R	S	S	S	S	S	
18-1250	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	Weak	S	R	S	S	R	S	S	
18-1968	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
18-2180	<i>S. hominis</i>	2018	Blood	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
ATCC 27844	<i>S. hominis</i>	NA	NA	No	S	S	S	S	S	S	S	
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA	Strong	S	S	S	S	S	S	S	

¹ All eleven strains were isolated in Monterrey, Mexico.

² Biofilm production was determined using the crystal violet staining method. Overnight plate cultures adjusted to 0.5 McFarland standard were diluted 1:100 in trypticase soy broth supplemented with 1% glucose (TSB_{glu1%}). Next, 200 µL were transferred to each well on sterile polystyrene 96-well flat-bottom plates. After 24 h incubation at 35 °C, the biofilm was washed with PBS buffer pH 7. The biofilm cells were fixed with methanol for 15 min, washed again, and stained with crystal violet (0.1%) for 15 min. After washing, the stained biofilm was dissolved with an ethanol-acetone mixture (7:3). The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm (OD₅₉₅) and classified as: OD₅₉₅ > 0.25, strong biofilm producers; 0.12 > OD₅₉₅ < 0.24, weak-biofilm producers; and OD₅₉₅ < 0.11, non-biofilm producers (Christensen et al., 1985).

³ DAP: daptomycin; LEV: levofloxacin; LZD: linezolid; TMP: trimethoprim; RIF: rifampin, and VAN: vancomycin. I: intermediate; R: resistant; S: susceptible.

spectrophotometer. All isolates were tested in quadruplicate. Previous OD₅₉₅ cut-off values were used to classify the isolates as mentioned above.

2.4. Antimicrobial susceptibility testing

2.4.1. Planktonic cells

AST was determined using the broth microdilution method using two different culture media, i.e., MHB and TSB_{glu1%} without supplements, supplemented with 50 µg/mL calcium (MHB_{Ca} and TSB_{glu1%Ca}, respectively), or with 2% NaCl (MHB_{NaCl} and TSB_{glu1%NaCl}, respectively). The assays were performed following the methodologies recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2021). The agents included were linezolid, trimethoprim, vancomycin, levofloxacin, oxacillin, daptomycin, and rifampicin (Sigma-Aldrich). Stock solutions at 2,048 µg/mL were prepared from each powdered antibiotic and kept at -80 °C until they were used. A bacterial inoculum corresponding to the 0.5 McFarland standard in sterile saline solution was used. Aliquots of 1:150 dilutions in the different culture media used were transferred to 96-well round-bottom plates (Corning Inc.) containing 100 µL of serial dilutions of antibiotics. MHB and TSB_{glu1%} without supplements were used in the assays of linezolid, trimethoprim, vancomycin, levofloxacin, and rifampicin. MHB_{Ca} and TSB_{glu1%Ca} were used in the assays of daptomycin and MHB_{NaCl} and TSB_{glu1%NaCl} were used in the assays of oxacillin. Plates were incubated in aerobic conditions for 18–24 h at 37 °C according to the incubation time of each antibiotic. All isolates were tested in triplicate. The minimum inhibitory concentration (MIC) was then determined. AST of the nine biofilm-producer strains showed high resistance to trimethoprim (100%) and oxacillin (88.9%). Resistance to levofloxacin and linezolid was 33.3% and 44.4%, respectively. High susceptibility to vancomycin, daptomycin, and rifampicin (100% each) was also detected.

2.4.2. Biofilm cells

2.4.2.1. Flat-bottom plates. A 0.5 McFarland standard bacterial suspension was diluted 1:100 in either TSB_{glu1%} or MHB. Then, 200 µL were transferred to 96-well flat bottom plates with conventional lids and incubated for 24 h at 37 °C. After planktonic cells were discarded, and the wells were washed twice with PBS buffer, 200 µL were added of serial dilutions of each antibiotic in MHB and TSB_{glu1%} without

supplements, and in MHB_{NaCl} or TSB_{glu1%NaCl} for oxacillin. After incubation time (18 to 24 h, depending on the antibiotic), antibiotics were discarded, and the wells were washed twice with PBS buffer. Then, each well was filled with 200 µL of TSB and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the turbidity was observed to determine the MBEC.

2.4.2.2. Calgary device. A bacterial inoculum of 0.5 McFarland was diluted 1:50 in TSB_{glu1%}. Aliquots of 150 µL were transferred to the Calgary plates and incubated for 24 h at 37 °C with agitation at 150 rpm. The lid was then transferred into a new microtiter plate containing the serial dilutions of each antibiotic (linezolid, trimethoprim, vancomycin, and levofloxacin) in MHB. The biofilms were exposed to the antibiotics for 18 or 24 h, depending on the antibiotic. After this period, the lid with the biofilms formed on the pins was removed and placed in a new microtiter plate containing fresh sterile TSB. The biofilm was then disrupted by sonication (Branson 5800 Ultrasonic Cleaner, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) at 40 kHz for 5 min. The lid with the pins was replaced with a conventional sterile lid and the microtiter plate was incubated for 24 h at 37 °C. The turbidity was observed to determine the minimum biofilm eradication concentration (MBEC).

The number of fold dilutions between MBEC and MIC concentrations were obtained using the next formula, which was first used in this study based on the ratio mathematical formula and applying the properties of logarithms, using log₂ to normalized data (Ambrosius, 2007):

$$\text{Fold dilution number} = \log_2 \text{MBEC} - \log_2 \text{MIC}$$

2.5. Biofilm production inhibition with subinhibitory concentrations of antibiotics

A 0.5 McFarland standard suspension was diluted 1:50 in either MHB or TSB_{glu1%}. Next, 100 µL of bacterial suspensions were transferred to flat-bottom plates and 100 µL of subinhibitory concentrations of the MIC (subMIC) of each antibiotic (linezolid, trimethoprim, and levofloxacin) were added to the wells. The final concentration ranged from 1/2 to 1/8 of the MIC obtained for each antibiotic. The remaining steps of the protocol, i.e., incubation time, washing, staining, and measuring, occurred as previously mentioned.

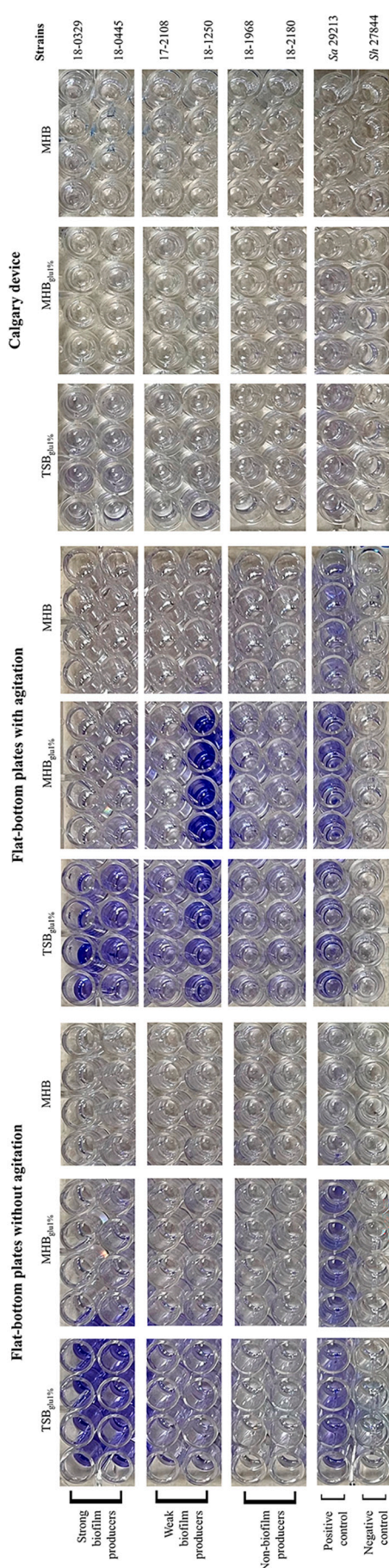


Fig. 1. Determination of biofilm production of *Staphylococcus hominis* with three methodologies. Biofilm production was determined using the crystal violet staining method using three different media: trypticase soy broth supplemented with 1% glucose (TSB_{glu1%}), Mueller-Hinton broth (MHB), or Mueller-Hinton broth supplemented with 1% glucose (MHB_{glu1%}). Flat-bottom plates were used with and without agitation at 150 rpm, in addition to the Calgary device. Two strong biofilm producer strains (18-0329 and 18-0445), two weak producer strains (17-2108 and 18-1250), and two non-biofilm producer strains (18-1968 and 18-2180) were evaluated. ATCC *S. aureus* 29,213 strain was used as a positive control of biofilm production, and ATCC *S. hominis* 27,844 strain was used as a negative control of biofilm production. The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm (OD₅₉₅) in a spectrophotometer. All isolates were tested in quadruplicate. Previous OD₅₉₅ cut-off values were used to classify the isolates as follows: OD₅₉₅ > 0.25, strong biofilm producers; 0.12 > OD₅₉₅ < 0.24, weak-biofilm producers; and OD₅₉₅ < 0.11, non-biofilm producers (Christensen et al., 1985). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2.6. Statistical analysis

To evaluate the changes in the MICs of the strains with the different culture media, geometric means of this value were calculated to consider the scaling ratio of the variant. In addition, to statistically contrast the differences between the MIC values of the same strains with the treatments, the Wilcoxon signed-rank test was used for paired samples.

3. Results

3.1. Biofilm production of *S. hominis*

Eleven clinical isolates of *S. hominis* obtained from blood cultures were included in the study (Table 1). Of these, 9 strains were biofilm-producers (4 strong biofilm-producers and 5 weak biofilm-producers) according to the crystal violet staining method using previously proposed cut-off values (Christensen et al., 1985). AST in these strains showed high resistance to trimethoprim (100%) and oxacillin (88.9%). Resistance to levofloxacin and linezolid, was 44.4% and 33.3%, respectively. High susceptibility to vancomycin, daptomycin, and rifampicin (100% each) was also detected.

Biofilm production was determined in six of these selected randomly isolates, using the crystal violet staining method, adding three different media: TSB_{glu1%}, MHB_{glu1%}, or MHB (Fig. 1) and three different methodologies: flat-bottom plates with and without agitation, and Calgary device (Fig. 1). In the first assay, the four isolates (two strong and two weak producers) were biofilm producers only when the biofilm determination included the use of TSB_{glu1%}. No biofilm production of these same isolates was observed using Mueller-Hinton media either with or without glucose. In the second assay, the addition of agitation also allowed the detection of biofilm production in TSB_{glu1%}. Furthermore, the biofilm production in one weak producer strain was increased in MHB_{glu1%}. In the third assay, the usage of the Calgary device did not produce biofilms in neither weak nor strong biofilm producer strains.

3.2. Antimicrobial susceptibility testing

3.2.1. Planktonic cells

For most antibiotics except rifampin and linezolid, the resulting MIC was higher when using TSB_{glu1%} (Table 2). In all six *S. hominis* strains, the MIC determined for trimethoprim, oxacillin, and daptomycin, was two-to-four-fold times higher when using TSB_{glu1%} in comparison to MHB ($p = 0.0313$ for each antibiotic). The exception was oxacillin, in which the reference strain *S. aureus* 29,213 showed a one-fold higher MIC in MHB than TSB_{glu1%}. No differences were observed between both media in *S. hominis* 27,844. The MIC of vancomycin ($p = 0.1250$), levofloxacin, ($p = 0.1250$) and rifampicin ($p = 0.2500$) showed no statistical differences in the media used. The resulting MIC for linezolid ($p = 0.0625$) was up to two-fold times higher when using MHB in comparison to TSB_{glu1%}, except for isolate 18-1018, which showed no difference. However, this difference did not reach statistical significance.

3.2.2. Biofilm cells

3.2.2.1. Calgary device. The determination of AST of linezolid, trimethoprim, vancomycin, and levofloxacin in MHB using the Calgary device yielded several technical difficulties and discrepancies among the results (Fig. 2). In one of the isolates, the MBEC could not be determined due to the low concentration of the antibiotics. However, in both cases, wells devoid of positive cultures could be observed randomly through the plate, which hindered the determination of a specific MBEC.

3.2.2.2. Flat-bottom plates. AST in biofilm cells was determined in flat-bottom plates using the same media and conditions described above for

Table 2Antimicrobial susceptibility in planktonic cells of *Staphylococcus hominis* isolates using two different culture media.

Strain	Minimum inhibitory concentration (MIC) µg/mL													
	Linezolid		Trimethoprim		Vancomycin		Levofloxacin		Oxacillin ¹		Daptomycin ²		Rifampin	
	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB
17-1211	32	128	512	128	2	2	512	256	256	64	1	0.25	0.002	0.008
17-1214	32	128	512	128	2	1	256	256	256	64	1	0.25	0.002	0.008
17-1523	32	128	512	128	4	1	512	256	128	16	1	0.25	0.004	0.008
18-1018	1	1	256	64	2	2	256	256	256	16	1	0.25	0.004	0.004
18-1031	0.5	1	128	64	1	0.5	0.12	0.06	0.12	0.06	1	0.25	≤0.016	≤0.016
18-1250	0.5	1	128	64	1	0.5	1	0.5	64	4	0.5	0.12	≤0.016	≤0.016
Sa 29,213	8	4	8	2	2	1	0.25	0.12	0.12	0.25	1	0.25	0.004	0.016
Sh 27,844	2	1	8	2	2	1	0.12	0.06	0.06	0.06	0.25	0.12	0.002	0.004
Geometrical mean	4.49	11.31	287.35	90.51	1.78	1.00	35.68	22.47	50.45	7.95	0.89	0.22	0.01	0.01
Wilcoxon's signed-rank test (p value) ³	0.0625		0.0313		0.1250		0.1250		0.0313		0.0313		0.2500	

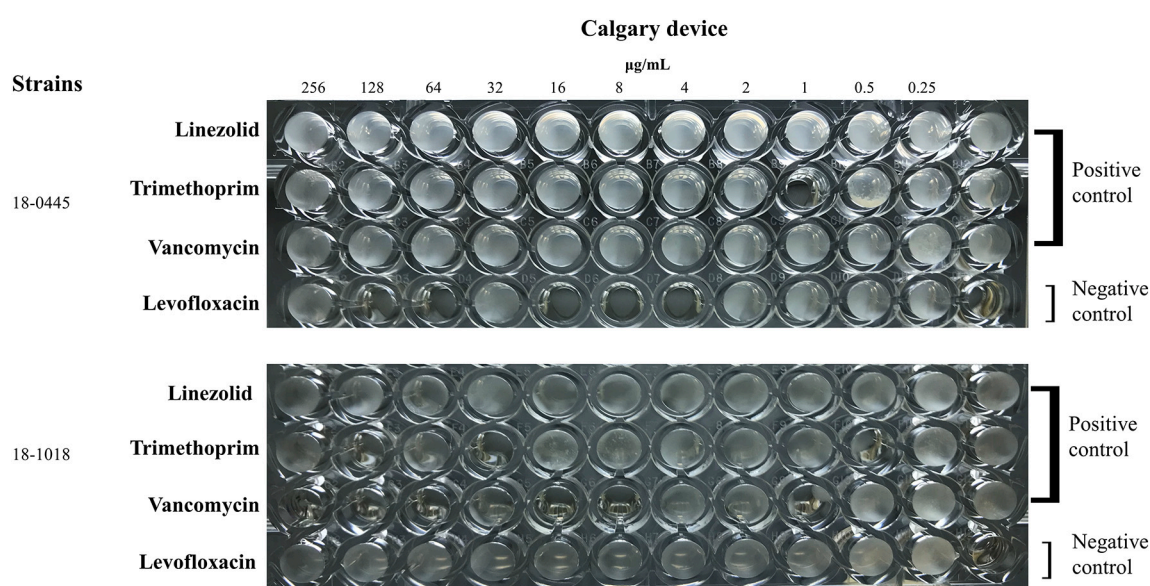
¹ TSB_{glu1%} and MHB supplemented with 2% NaCl.² TSB_{glu1%} and MHB supplemented with 50 µg/mL Ca²⁺.³ p significant values are remarked in bold.

Fig. 2. Determination of antimicrobial susceptibility testing (AST) in biofilm cells of *Staphylococcus hominis* with the Calgary device. AST was determined using the Calgary device in which the lid with pre-formed biofilm on the pins was transferred into a new microtiter plate containing the serial dilutions of linezolid, trimethoprim, vancomycin, and levofloxacin in Mueller-Hinton broth (MHB). The final concentration ranged from 0.25 to 256 µg/mL of each antibiotic. Two biofilm producer strains were evaluated (18-0445, strong, and 18-1018, weak). After antibiotic exposure, the biofilm was disrupted by sonication at 40 kHz for 5 min, and incubated 24 h at 37° C. The turbidity was observed to determinate the minimum biofilm eradication concentration (MBEC). ATCC *S. aureus* 29,213 strain was used as positive control.

Table 3Antimicrobial susceptibility in biofilm cells of *Staphylococcus hominis* isolates using flat-bottom plates and two different culture media.

Strain	Minimal biofilm-eradication concentration (MBEC) µg/mL									
	Linezolid		Trimethoprim		Vancomycin		Levofloxacin		Oxacillin ¹	
	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB
17-1211	512	512	512	512	32	8	512	512	512	512
17-1214	512	512	512	512	8	32	512	512	512	512
17-1523	128	512	512	512	8	32	512	256	512	512
18-1018	64	64	512	512	8	32	512	512	512	512
18-1031	64	32	32	32	32	32	1024	1024	32	32
18-1250	32	32	32	32	32	32	1024	1024	64	64
Sa 29,213	128	128	512	256	32	64	16	16	16	16
Geometrical mean	128.00	143.68	203.19	203.19	16.00	25.40	645.08	574.70	228.07	228.07
Wilcoxon's signed-rank test (p value) ²	>0.9999		>0.9999		0.6250		>0.9999		NC	

¹ TSB_{glu1%} and MHB supplemented with 2% NaCl.² p value non-calculable under Wilcoxon's signed-rank test; all rows have the same difference.

Table 4

Fold dilution differences of the minimal biofilm-eradication concentration (MBEC) and minimum inhibitory concentration (MIC) of *Staphylococcus hominis* isolates using two different culture media.

Strain	Fold dilution differences between MBEC and MIC									
	Linezolid		Trimethoprim		Vancomycin		Levofloxacin		Oxacillin ¹	
	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB	TSB _{glu1%}	MHB
17-1211	4	2	0	2	4	2	0	1	1	4
17-1214	4	2	0	2	2	5	1	1	1	4
17-1523	2	2	0	2	1	5	0	0	2	5
18-1018	6	6	1	3	2	4	1	1	1	5
18-1031	7	5	2	1	5	6	13	14	8	9
18-1250	6	5	2	1	5	6	10	11	0	4
Sa 29,213	4	5	6	7	4	6	6	7	7	6
Fold-dilution mean	4.83	3.67	0.83	1.83	3.17	4.67	4.17	4.67	2.17	5.17

¹ TSB_{glu1%} and MHB supplemented with 2% NaCl.

linezolid, trimethoprim, vancomycin, levofloxacin, and oxacillin. In almost all isolates, the MBEC observed showed no differences after using either TSB_{glu1%} or MHB media (Table 3). In the case of trimethoprim, only *S. aureus* 29,213 had a MBEC one-fold higher in MHB than TSB_{glu1%}. The isolate 17-1523 had a MBEC for levofloxacin one-fold higher in TSB_{glu1%}. None of the isolates showed differences between media for oxacillin. Regarding vancomycin, the MBEC of three strains obtained in TSB_{glu1%} showed a four-fold increase in MHB, although the MBEC of another strain showed a four-fold decrease. The MBEC of linezolid of *S. hominis* 17-1523 strain obtained in TSB_{glu1%} showed a two-fold increase in MHB.

The differences between the MBEC and MIC obtained to linezolid, trimethoprim, vancomycin, levofloxacin, and oxacillin were variable among the strains (Table 4). The range of MBEC for all antibiotics tested was higher than the MIC, up to three-fold for trimethoprim, six-fold for vancomycin, seven-fold for linezolid, nine-fold for oxacillin, and fourteen-fold for levofloxacin. Higher fold dilution values were obtained in MHB, except for linezolid (all isolates), vancomycin (one isolate), and trimethoprim (two isolates), in which TSB_{glu1%} allowed to determine higher fold dilution values compared to MHB.

3.3. Inhibition of biofilm with subinhibitory concentrations of antibiotics

The effect of subMICs of linezolid, trimethoprim, and levofloxacin ($\frac{1}{2}$ to $\frac{1}{8}$) was assessed in TSB_{glu1%} or MHB (Fig. 3). When using TSB_{glu1%}, subMICs of linezolid at $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, and $\frac{1}{8}$ inhibited biofilm formation of one strain (18-1031) whereas only the subMIC at $\frac{1}{2}$ inhibited biofilm formation in the other strain (18-1250). In the case of trimethoprim, the biofilm of the 18-1031 strain was not inhibited at either subMIC used, whereas the biofilm formation of 18-1250 strain was inhibited at $\frac{1}{2}$ subMIC. Finally, the biofilm formation of the 18-1031 strain was inhibited at $\frac{1}{2}$ subMIC of levofloxacin, whereas the biofilm of 18-1250 strain was not inhibited at either subMIC used. When using MHB, all three antibiotics completely inhibited biofilm production regardless of the subMIC used. Furthermore, a floating biofilm structure was observed in the wells before the washing and staining steps (Fig. S1).

4. Discussion

Drug susceptibility testing methodologies against staphylococcal biofilms can have differences in methodological approaches, which consequently can end in discrepancies among the results. Mueller-Hinton broth (MHB) is used worldwide to perform in vitro AST, and it is recommended for broth microdilution by the CLSI (CLSI, 2021). MHB contains beef extract, casein hydrolysate, and starch, which provide nutrients to allow the growth of microorganisms. Meanwhile, biofilm production determination on microtiter plates is usually performed using trypticase soy broth (TSB) supplemented with 1% glucose (Stepanovic et al., 2007). TSB contains tryptone, soytone, glucose, sodium

chloride, and dipotassium hydrogen phosphate. Specifically, biofilm determination of *S. hominis* and other CoNS, in addition to *S. aureus*, is usually evaluated using colorimetric microtiter plate assays and TSB (de Castro Melo et al., 2013; Oliveira and Cunha Mde, 2010; Ortega-Pena et al., 2019; Soroush et al., 2017; Szczuka et al., 2015). Given that MHB is recommended in AST assays in planktonic cells to obtain the MIC, consequently the MBEC in biofilm cells should also be obtained using MHB. However, due to inconsistent results in our study using MHB to obtain the MBEC, we aimed to improve AST in biofilm-growing *S. hominis* strains by comparing biofilm and AST methodologies in biofilm cells.

In our study, we included *S. hominis* biofilm-producing clinical isolates and evaluated their biofilm production performance in three different media: TSB and MHB supplemented with glucose and MHB without supplements. Furthermore, the use of flat-bottom plates with and without agitation, and the Calgary device were also assessed. TSB_{glu1%} yielded better performance over MHB, as both strong and weak biofilm producer strains showed biofilm production only in TSB_{glu1%}. The use of MHB with or without glucose yielded no biofilm production of these same isolates. While the implementation of an agitation step also yielded biofilm production using TSB_{glu1%}, it also increased biofilm production of a weak producer strain in MHB_{glu1%}. However, results were variable and unreliable among the analyzed strains. In another study, MHB was also evaluated in a microtiter plate assay to determine biofilm formation in *Staphylococcus* strains. The sensitivity was 62% for *S. aureus* strains, and 70% for *S. epidermidis* strains (Esteban et al., 2010).

Most in vitro biofilm models evaluating AST utilize the Calgary biofilm device (Ceri et al., 1999; Macia et al., 2014). Recently, the determination of optimal conditions for staphylococcal biofilm formation on pegs was studied (Diepoltova et al., 2021). Based on their results, *S. aureus* and *S. epidermidis* showed completely different biofilm production outcomes. Whereas biofilm formation of *S. aureus* was improved by shaking and TSB supplementation with human plasma, biofilm production increased on pegs directly coated with fetal bovine serum or human plasma for *S. epidermidis*. However, our results showed that neither strong nor weak biofilm-producing *S. hominis* strains yielded biofilm production when using the Calgary device. A possible answer to this issue may be the fact that *S. hominis* is a non-mobile bacterium, and consequently not enough bacterial cells adhered to the pegs within the Calgary device. None of the three media employed, i.e., TSB_{glu1%}, MHB_{glu1%}, or MHB, had an impact on biofilm formation on these strains with the Calgary device. Furthermore, the determination of susceptibility to linezolid, trimethoprim, vancomycin, and levofloxacin in biofilm cells using the Calgary device and MHB yielded several discrepancies among the results, such as wells devoid of positive culture randomly observed through the plate, which hindered the determination of a specific MBEC. Consequently, the media in which the biofilm production showed higher performance was TSB_{glu1%} over MHB, and flat-bottom polystyrene plates without agitation were preferred over the

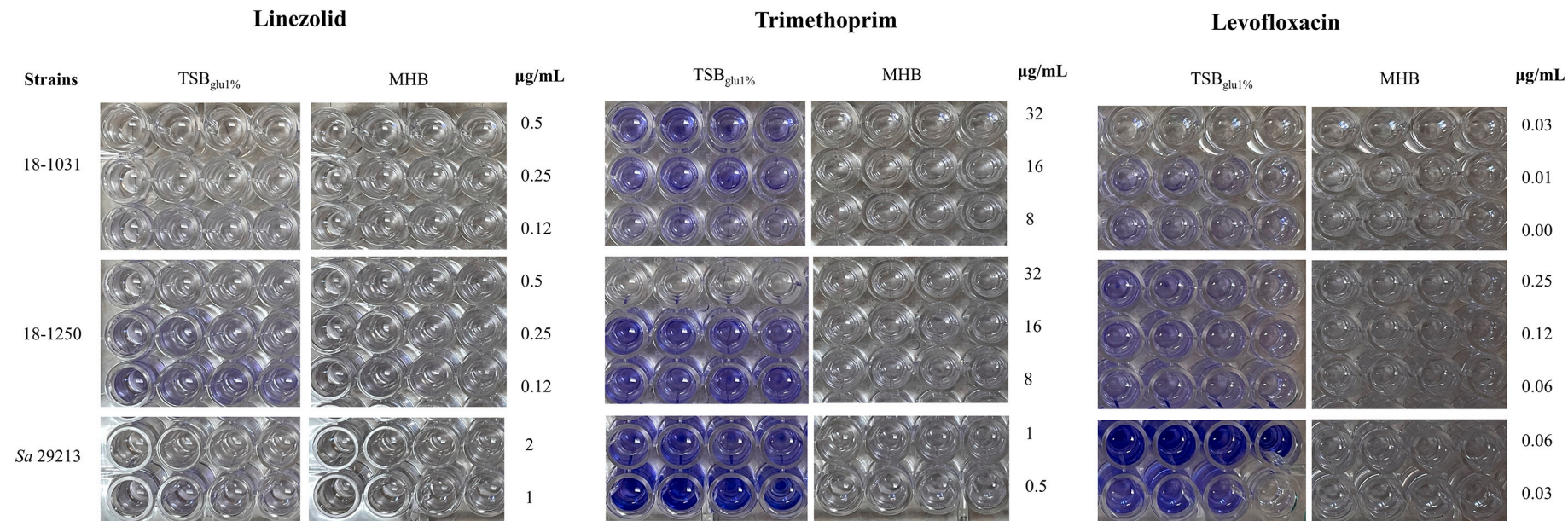


Fig. 3. Determination of biofilm production of *Staphylococcus hominis* with subinhibitory concentrations of antibiotics in two different media. Biofilm production was determined using the crystal violet staining method using two different media: trypticase soy broth supplemented with 1% glucose (TSB_{glu1%}), and Mueller-Hinton broth (MHB). Flat-bottom plates were used without agitation. Subinhibitory concentrations of the MIC (subMICs) of linezolid, trimethoprim, and levofloxacin ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, and $\frac{1}{8}$) were assessed. The final concentration ranged from 0.5 to 0.12 µg/mL of linezolid, 32 to 8 µg/mL of trimethoprim, and 0.03 to 0.00 and 0.25 to 0.06 µg/mL of levofloxacin, which corresponded to the $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, and $\frac{1}{8}$ of the MIC obtained for each antibiotic. Two weak producer strains (18-1031 and 18-1250) were evaluated. ATCC *S. aureus* 29,213 strain was used as a positive control of biofilm production. The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm (OD₅₉₅) in a spectrophotometer. All isolates were tested in quadruplicate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Calgary device.

While the concentrations of the antibiotics used in standard AST can be effective against planktonic bacteria *in vitro*, they are not necessarily predictive of the concentrations required to eradicate biofilm cells. Susceptibility to antibiotics is known to vary among planktonic and biofilm cells. Therefore, the comparison of the MBEC and the MIC obtained in biofilm and planktonic cells, respectively, allows the evaluation of biofilm susceptibility to antibiotics *in vitro* (Brady et al., 2017; Thieme et al., 2019). In a previous study, the effect of antibiotics on biofilms was evaluated on other CoNS such as *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* utilizing a colorimetric method based on the reduction of a tetrazolium salt to measure cell viability (Cerca et al., 2005). Dicloxacillin, cefazolin, vancomycin, tetracycline, and rifampicin all had a higher impact on planktonic cells than biofilm cells. According to our results, AST assays performed in planktonic cells showed that the MIC was two to four times higher in TSB_{glu1%} than MHB for most antibiotics, e.g., trimethoprim ($p = 0.031$), oxacillin ($p = 0.0313$), daptomycin ($p = 0.0313$), vancomycin ($p = 0.1250$), and levofloxacin ($p = 0.1250$). Nevertheless, the results were also variable among different bacterial strains, as in some strains the resulting MIC for linezolid ($p = 0.0625$) and rifampin ($p = 0.2500$) was up to four times higher when using MHB. Instead, the assessment of AST in biofilm cells revealed no differences after using either medium for most antibiotics, such as trimethoprim, levofloxacin, and oxacillin. However, results for vancomycin were variable among the strains, and MBECs obtained in TSB_{glu1%} should be taken with caution.

Moreover, the differences between the MBEC and MIC obtained to linezolid, trimethoprim, vancomycin, levofloxacin, and oxacillin were variable among the strains. Whereas the fold dilution difference between MBEC and MIC obtained for trimethoprim, vancomycin, levofloxacin, and oxacillin were higher in MHB than TSB_{glu1%}, results were contrary for linezolid. Furthermore, the MBEC obtained for all antibiotics tested was higher than the MIC, up to fourteen-fold for levofloxacin.

Similar to our results, in another study with strong biofilm-producing *S. hominis* isolates, the MBECs were higher than the MICs for linezolid, vancomycin, oxacillin, amikacin, ciprofloxacin, and chloramphenicol (Mendoza-Olazarán et al., 2015). Likewise, the MBECs obtained for penicillin, oxacillin, clindamycin, tetracycline, and vancomycin in *Staphylococcus* strains were also increased compared to the MICs (Brady et al., 2017). A previous study of *S. saprophyticus* strains reports that the minimal biofilm inhibitory concentration of vancomycin, oxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, and norfloxacin obtained in biofilm cells was up to 32 times higher compared to the MIC obtained for the planktonic cells (Martins et al., 2019a, 2019b). The MICs of *S. aureus* and CoNS strains to oxacillin, vancomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin, and gentamicin were 2 to 16 times higher for biofilm cells than for planktonic cells (de Oliveira et al., 2016). In contrast to our results, in which three of *S. hominis* strains were resistant to linezolid in both planktonic and biofilm cells, these authors reported that none of the *S. aureus* and CoNS strains were resistant to linezolid in neither planktonic nor biofilm cells (de Oliveira et al., 2016).

Exposure to low or sub-inhibitory concentrations of antibiotics can cause biofilm structure changes, which can depend on species and specific antibiotics (Song et al., 2016). In our study, the effect of subMICs of linezolid, trimethoprim, and levofloxacin was strain- and media-dependent. With TSB_{glu1%}, ½ subMIC of linezolid, trimethoprim, and levofloxacin successfully inhibited *S. hominis* biofilm formation. Instead, with MHB, all three antibiotics fully inhibited biofilm production regardless of the subMIC used.

One of the limitations of this study is that we did not evaluate drug susceptibility testing in biofilm cells *in vivo*. This assessment may not reflect the effective antibiotic concentrations against the biofilm *in vivo* (Coenye et al., 2018). Thus, accurate antimicrobial regimens would not be rapidly detected, leading to treatment failure.

5. Conclusions

The determination of biofilm production in *S. hominis* using TSB_{glu1%} yielded better performance over MHB, as both strong and weak biofilm producer strains showed biofilm production only in TSB_{glu1%}. Moreover, flat-bottom polystyrene plates without agitation were preferred over the Calgary device. No biofilm production was detected in the Calgary device regardless of the medium used. Inconsistent results were obtained in AST assays on biofilm cells using Calgary and MHB. The MIC in planktonic cells was higher in TSB_{glu1%} than MHB whereas the MBEC in biofilm cells showed no differences in any medium. AST in biofilm-growing *S. hominis* showed better performance using TSB_{glu1%} over MHB. In this context, when comparing MBEC and MIC values, AST in planktonic cells could also be performed using TSB_{glu1%}.

Funding

This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación para la Educación of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico [grant number A1-S-16392].

Declaration of Competing Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106493>.

References

- Ambrosius, W.T.A.T., 2007. Topics in Biostatistics. Humana Totowa, NJ.
- Becker, K., Both, A., Weisselberg, S., Heilmann, C., Rohde, H., 2020. Emergence of coagulase-negative staphylococci. Expert Rev. Anti-Infect. Ther. 18, 349–366.
- Brady, A.J., Lavery, G., Gilpin, D.F., Kearney, P., Tunney, M., 2017. Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? J. Med. Microbiol. 66, 461–469.
- Bruker, 2011. MALDI Biotyper 3.1 Real Time Classification (RTC) User Manual. Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany.
- de Castro Melo, P., Ferreira, L.M., Filho, A.N., Zafalon, L.F., Vicente, H.I., de Souza, V., 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Braz. J. Microbiol. 44, 119–124.
- Cerca, N., Martins, S., Cerca, F., Jefferson, K.K., Pier, G.B., Oliveira, R., Azeredo, J., 2005. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. J. Antimicrob. Chemother. 56, 331–336.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A., 1999. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J. Clin. Microbiol. 37, 1771–1776.
- Chaves, F., Garcia-Alvarez, N., Sanz, F., Alba, C., Otero, J.R., 2005. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. 43, 4877–4879.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D. M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiol. 22, 996–1006.
- CLSI, 2021. M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 31st. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coenye, T., Goeres, D., Van Bambeke, F., Bjarnsholt, T., 2018. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? Clin. Microbiol. Infect. 24, 570–572.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318–1322.
- Diepoltova, A., Konecna, K., Jandourek, O., Nachtigal, P., 2021. Study of the impact of cultivation conditions and peg surface modification on the *in vitro* biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in a system analogous to the Calgary biofilm device. J. Med. Microbiol. 70.
- Esteban, J., Molina-Manso, D., Spiliopoulou, I., Cordero-Ampuero, J., Fernandez-Roblas, R., Foka, A., Gomez-Barrena, E., 2010. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. Acta Orthop. 81, 674–679.
- Franca, A., Gaio, V., Lopes, N., Melo, L.D.R., 2021. Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. Pathogens. 10.

- Frickmann, H., Hahn, A., Skusa, R., Mund, N., Viehweger, V., Koller, T., Koller, K., Schwarz, N.G., Becker, K., Warnke, P., Podbielski, A., 2018. Comparison of the etiological relevance of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 1539–1545.
- Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Marli, M., Fernandez, L., Garcia, P., Kjos, M., Diep, D.B., 2021. Staphylococcal biofilms: challenges and novel therapeutic perspectives. *Antibiotics (Basel)* 10.
- Lisowska-Lysiak, K., Lauterbach, R., Miedzobrodzki, J., Kosecka-Strojek, M., 2021. Epidemiology and pathogenesis of *Staphylococcus* bloodstream infections in humans: a review. *Pol. J. Microbiol.* 70, 13–23.
- Macia, M.D., Rojo-Moliner, E., Oliver, A., 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 981–990.
- Martins, K.B., Ferreira, A.M., Pereira, V.C., Pinheiro, L., Oliveira, A.D., da Cunha, M.L.R. S., 2019a. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 10.
- Martins, K.B., Ferreira, A.M., Pereira, V.C., Pinheiro, L., de Oliveira, A., da Cunha, M., 2019b. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 10, 40.
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Villarreal-Trevino, L., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Camacho-Ortiz, A., González, G.M., Casillas-Vega, N., Garza-González, E., 2015. Antibiotic susceptibility of biofilm cells and molecular characterisation of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS One* 10, e0144684.
- Michels, R., Last, K., Becker, S.L., Papan, C., 2021. Update on coagulase-negative staphylococci-what the clinician should know. *Microorganisms.* 9.
- Oliveira, A., Cunha Mde, L., 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 3, 260.
- de Oliveira, A., Cataneli Pereira, V., Pinheiro, L., Moraes Riboli, D.F., Benini Martins, K., de Souza, Ribeiro, da Cunha Mde, L., 2016. Antimicrobial resistance profile of planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Ortega-Pena, S., Franco-Cendejas, R., Salazar-Saenz, B., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Díaz, M.E., Cancino-Díaz, J.C., 2019. Prevalence and virulence factors of coagulase negative *Staphylococcus* causative of prosthetic joint infections in an orthopedic hospital of Mexico. *Cir. Cir.* 87, 428–435.
- Song, T., Duperthuy, M., Wai, S.N., 2016. Sub-optimal treatment of bacterial biofilms. *Antibiotics (Basel)* 5.
- Soroush, S., Jabalameli, F., Taherikalani, M., Eslampour, M.A., Beigverdi, R., Emaneini, M., 2017. Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome mec analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from blood cultures of children. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 329–333.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, 891–899.
- Szczuka, E., Telega, K., Kaznowski, A., 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)* 60, 1–5.
- Szczuka, E., Krzyminska, S., Bogucka, N., Kaznowski, A., 2018. Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 1259–1265.
- Szemraj, M., Grazul, M., Balcerczak, E., Szewczyk, E.M., 2020. Staphylococcal species less frequently isolated from human clinical specimens - are they a threat for hospital patients? *BMC Infect. Dis.* 20, 128.
- Thieme, L., Hartung, A., Tramm, K., Klinger-Strobel, M., Jandt, K.D., Makarewicz, O., Pletz, M.W., 2019. MBEC versus MBIC: the lack of differentiation between biofilm reducing and inhibitory effects as a current problem in biofilm methodology. *Biol. Proc. Online* 21, 18.



Contents lists available at ScienceDirect

Indian Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.journals.elsevier.com/indian-journal-of-medical-microbiology

Original Research Article

Rapid methicillin resistance detection and subspecies discrimination in *Staphylococcus hominis* clinical isolates by MALDI-TOF MS

Verónica Villarreal-Salazar^a, Soraya Mendoza-Olazarán^b, Samantha Flores-Treviño^c,
Elvira Garza-González^c, Paola Bocanegra-Ibarias^c, Rayo Morfín-Otero^d, Adrián Camacho-Ortiz^c,
Eduardo Rodríguez-Noriega^d, Licet Villarreal-Treviño^{a,*}

^a Laboratorio de Microbiología General, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba S/N, Col. Ciudad Universitaria, 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

^b Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario "Dr. José E. González" y Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco I, Madero Pte. S/N Monterrey y Av. Gonzalitos, Col. Mitrás Centro, 64460, Monterrey, Nuevo León, México

^c Servicio de Infectología, Hospital Universitario "Dr. José E. González", Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco I, Madero Pte. S/N Monterrey y Av. Gonzalitos, Col. Mitrás Centro, 64460, Monterrey, Nuevo León, México

^d Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" y el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Staphylococcus hominis
Protein biomarkers
Methicillin resistance detection
Subspecies classification

ABSTRACT

Purpose: *Staphylococcus hominis* is a coagulase-negative opportunistic pathogen responsible for implanted medical device infections. Rapid identification and virulence factors detection are crucial for appropriate antimicrobial therapy. We aimed to search protein biomarker peaks for rapid classification of antibiotic resistance and subspecies of *S. hominis* using MALDI-TOF MS.

Methods: *S. hominis* clinical isolates (n = 148) were screened for subspecies differentiation by novobiocin resistance. Biofilm composition and formation were determined by detachment assay and crystal violet staining, respectively. Antibiotic susceptibility was performed by the broth microdilution method. The search for potential biomarkers peaks was enabled by ClinProTools 3.0, flexAnalysis 3.4, and Biotools 3.2 for statistical analysis, peak visualization, and protein/peptide alignment, respectively.

Results: Of 148 isolates, 12.16% were classified as *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, 77.77% were biofilm producers, and > 50% were multidrug-resistant. Two potential biomarker peaks, 8975 m/z and 9035 m/z were detected for the discrimination of methicillin resistance with a sensitivity of 96.72%. The following peaks were detected for subspecies differentiation: 2582 m/z, 2823 m/z, and 2619 m/z with 88.89–98.28% of sensitivity.

Conclusions: We found potential biomarker peaks to predict methicillin resistance and discriminate *S. hominis* subspecies during routine MALDI-TOF MS identification in a clinical setting to enable better antibiotic treatment.

1. Introduction

Between the coagulase-negative staphylococci (CoNS) group, *Staphylococcus hominis* is the third most frequent causal agent of bacteremia [1]. *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (SHN) is reported to be more virulent and resistant than *S. hominis* subsp. *hominis* (SHH) to last-resort antibiotics, such as linezolid [2,3]. Although *S. hominis* is an opportunistic pathogen, some strains cause severe infections that are difficult to treat due to multidrug resistance and other virulence characteristics such as biofilm formation. A biofilm protects the bacteria from the effect of

antibiotics and the host's immune system, increasing their survival and prolonging the infection [4,5]. It was reported that up to 85% of clinical *S. hominis* strains can form a biofilm [6], of these, over 90% are strong biofilm producers (5).

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) uses intact cells or cell extracts or rapid and early identification of diverse microorganisms by offering rapid, sensitive, and low-cost analysis in comparison with conventional phenotypic and molecular techniques [7]. Spectral patterns are obtained that provide a unique protein mass profile for each microorganism. These can be

* Corresponding author. Laboratorio de Microbiología General, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, CP 66450, México.

E-mail address: spirothrix@hotmail.com (L. Villarreal-Treviño).

<https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.08.008>

Received 21 November 2021; Received in revised form 6 June 2022; Accepted 14 August 2022

Available online xxx

0255-0857/© 2022 Indian Association of Medical Microbiologists. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

discriminated and identified using an established database. This approach has been used not only for microbial identification, but also for other purposes in clinical microbiology, including epidemiological studies, antibiotic resistance detection, and rapid discrimination of a specific phenotype or genotype [8].

This study aimed to search protein biomarker peaks based on MALDI-TOF MS profiles for rapid detection of antibiotic resistance and subspecies classification of *S. hominis* from clinical specimens.

2. Materials and methods

2.1. Clinical isolates and identification

We included 148 *S. hominis* clinical isolates from blood ($n = 145$, 97.9%) and cerebrospinal fluid ($n = 3$, 2.0%) collected from January 2006 to December 2016 at the Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” and Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González”, third-level hospitals in Jalisco and Nuevo Leon, Mexico, respectively.

Isolates were identified using direct colony method by MALDI TOF MS (Microflex LT system, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), following the manufacturer's instructions.

2.2. Ethics statement

This study was performed with approval from the Ethics Committee of the School of Medicine at the Universidad Autónoma de Nuevo León (approval number GA14-009). Given that only bacterial isolates were studied, and patient information was anonymized, informed consent was not required.

2.3. Subspecies differentiation

Novobiocin susceptibility testing was determined by disk diffusion [9, 10]. A 5 µg novobiocin disk was placed in Mueller-Hinton plates containing a 0.5 MacFarland inoculum. Plates were incubated in aerobic conditions for 24 h at 35 °C. Isolates with a zone of inhibition > 16 mm were classified as susceptible (SHH subspecies) and ≤ 16 mm were classified as resistant (SHN subspecies). For the assay, SHH ATCC 27844 was used as a negative control.

2.4. Biofilm production

Biofilm production determined using the crystal violet staining method [11] with minor modifications in the incubation time, fixation, and dissolvent for the stained biofilm. Briefly, overnight cultures were diluted at 1:100 in trypticase soy broth supplemented with 1% glucose. After 24 h incubation at 35 °C, planktonic cells were discarded and the biofilm was washed three times with sterile PBS 1X. After that, the biofilm was fixed with methanol for 15 min and stained with 0.1% crystal violet for 20 min. The stained biofilm was dissolved with an ethanol-acetone mixture 7:3 for 30 min. The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm (OD_{595}) in an iMark™ spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

2.5. Biofilm composition

It was determined by detachment assays in all biofilm-producing isolates ($n = 115$) [6]. Wells from 96-well microtiter plates containing 24 h old mature biofilm were washed and then were treated with either 40 mM NaIO₄ (Sigma-Aldrich, MO, USA), 0.1 mg/mL proteinase K (Bio-line, Taunton, MA, USA) or 0.5 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) for 24 h at 37 °C. Afterwards, biofilms were stained with the crystal violet solution as mentioned above, and the OD_{595} was measured. The percentage of biofilm detachment was calculated based on the average difference

between the treated and the control wells. The results were then analyzed using GraphPad 6.0 software (GraphPad Software Inc, CA, USA).

2.6. Antimicrobial susceptibility profile and *mecA* gene detection

Susceptibility testing was determined using the broth microdilution method [12,13] Oxacillin, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycin, vancomycin, linezolid, tetracycline, azithromycin, ciprofloxacin, gentamicin, chloramphenicol, and rifampicin (Sigma-Aldrich) were tested.

One hundred µL aliquots of 1:150 dilution from 0.5 MacFarland standards prepared in Müller-Hinton broth (MHB) and MHB with 2% of NaCl for oxacillin were transferred to 96 well round bottom plates containing 100 µL of serial dilutions of each antibiotic. Plates were incubated in aerobic conditions for 24 h for vancomycin and oxacillin and the remaining antibiotics for 16–20 h at 35 °C. *S. aureus* ATCC 29213 was used for antibiotic quality control. To confirm methicillin resistance, detection of the *mecA* gene was performed by standard PCR assay as previously reported [14].

2.7. Mass spectra patterns

Raw spectra obtained from MALDI TOF MS isolate identification were imported into the ClinProTools 3.0 software (Bruker Daltonics) for recognition of mass spectra patterns using the default parameters. Patterns were compared among isolates according to subspecies classification, biofilm production, biofilm composition, and susceptibility profiles to each of the antibiotics mentioned above.

2.8. Statistical analysis and peak selection

For the selection of statistically significant peaks, Anderson Darling, Student *t*, and Wilcoxon statistical tests were performed to determine the distribution of the population, test for normally distributed data and test for not normally distributed data, respectively. A *t*-test or Wilcoxon test *P*-value ≤ 0.05 was considered significantly difference between peaks.

To determine the accuracy of the peak biomarker classification, the receiver operating characteristics (ROC) curve and the area under the curve (AUC) were directly obtained from the ClinProTools 3.0 software and used to determine the biomarker performance. For this task, AUC values ≥ 0.80 , ≥ 2 arbitrary units, and a coefficient of variation less than 30% between peak groups were considered. The sensitivity, specificity, positive, and negative predictive values (PPV and NPV, respectively) were calculated for each peak selected.

2.9. Peptide/protein identity assignment

All the MS spectra of not susceptible and susceptible isolates were analyzed using flexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics) in which top-hat baseline subtraction, spectra smoothing, and normalization were performed. For protein/peptide identification the MS spectra were exported to the Biotoools 3.2 software (Bruker Daltonics), in which either peptide or protein assignment was performed by Mascot Server (Matrix Science, Boston, USA) and run against the SwissProt database.

3. Results

3.1. Subspecies classification, biofilm formation and composition

Novobiocin resistance was detected in 18 (12.2%) isolates, which were classified as SHN; the remaining 130 (87.3%) isolates were novobiocin susceptible and classified as SHH.

A total of 115 (77.7%) were biofilm producers, of which 96 (83.5%) were strong producers, whereas 19 (16.5%) were weak producers.

Proteins were the primary biofilm component with 91.2% mean detachment and a mean OD_{595} of 0.262 ± 0.1 . The detachment values for carbohydrates varied from 5% to 80%, with a mean OD_{595} of 2.247 ± 0.1

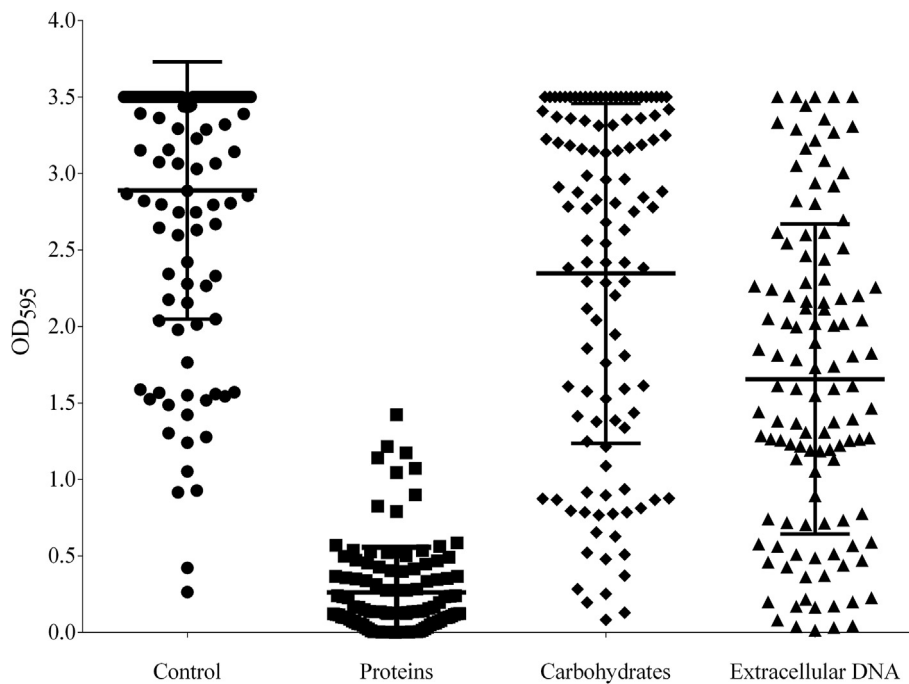


Fig. 1. Biofilm composition of *S. hominis* isolates. The OD_{595} of each isolate is shown before and after treatment with either proteinase K to degrade proteins, $NaIO_4$ to degrade β -1,6-linked polysaccharides, and DNase I to degrade extracellular DNA. The mean and the standard deviation for each group are also shown.

and the detachment values for extracellular DNA varied from 2% to 95%, with a mean OD_{595} of 1.656 ± 0.1 . (Fig. 1).

3.2. Antimicrobial susceptibility

The isolates included in this study displayed high resistance to ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycin, oxacillin, azithromycin, and erythromycin, with percentages of isolate resistance ranging from 50% to 90% (Fig. 2). In addition, none of the isolates was

resistant to vancomycin and only five isolates (3%) were resistant to linezolid. The presence of *mecA* gene was detected in all methicillin resistance isolates (82%).

3.3. MALDI-TOF MS biomarker peaks

3.3.1. Methicillin resistance

The generated mass spectra patterns by MALDI-TOF MS had mass charge ratio (m/z) values between 2000 and 20,000. The comparison of

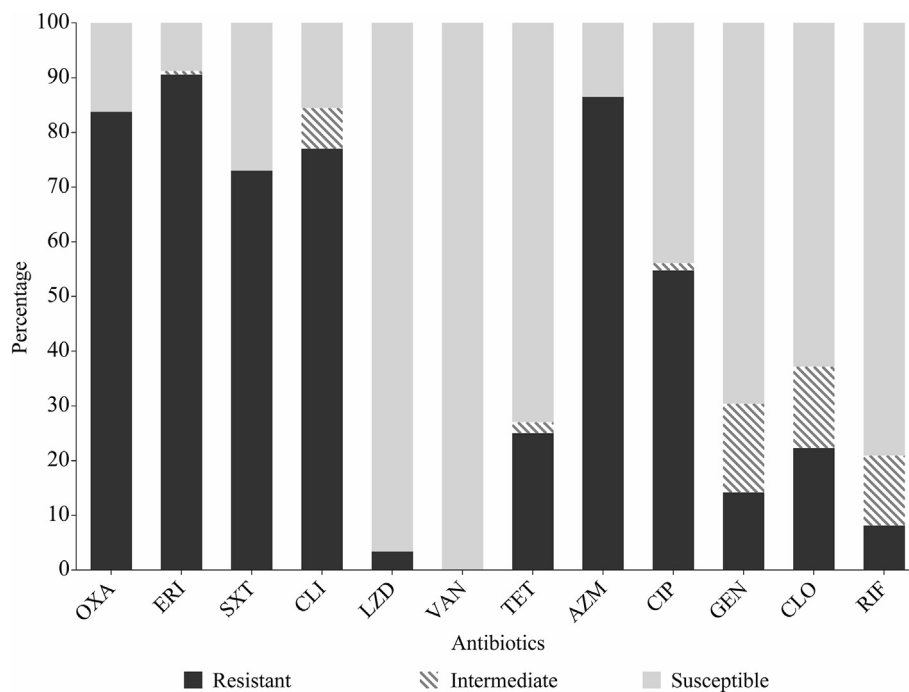


Fig. 2. Susceptibility profile of *S. hominis* isolates. AZM, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; CLO, chloramphenicol; ERI, erythromycin; GEN, gentamicin; LZD, linezolid; OXA, oxacillin; RIF, rifampicin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TET, tetracycline, and VAN, vancomycin.

methicillin (oxacillin) susceptible ($MIC \leq 0.25 \mu\text{g/mL}$, $n = 24$) and not susceptible ($MIC \geq 0.5 \mu\text{g/mL}$, $n = 124$) isolates yielded eight statistically significant peaks. Two peaks, with $8975 m/z$ and $9035 m/z$ met the selection criteria (AUC values ≥ 0.80 , ≥ 2 arbitrary units, and a coefficient of variation less than 30% between peak groups were considered) to predict methicillin resistance in *S. hominis* (Table 1). The presence of the $8975 m/z$ peak and the absence of the $9035 m/z$ peak in not susceptible isolates were associated with a methicillin resistance phenotypic profile in 95.96% of isolates with a sensitivity of 96.72% (Fig. 3).

3.3.2. Subspecies differentiation

The protein profile comparison between SHN ($n = 18$) and SHH ($n = 58$) yielded 29 statistically significant peaks with AUC values ≥ 0.90 . Of these, three peaks were selected as potential biomarker peaks due to their acceptable performance to achieve peaks with good quality (Fig. 4). Two peaks $2582 m/z$ and $2823 m/z$ were found in

88.89% of SHN subspecies and one peak $2619 m/z$ was present in 98.28% of SHH subspecies (Table 1).

3.3.3. Biofilm production

The comparison of biofilm-producing and non-biofilm producing isolates yielded 35 statistically significant peaks. However, none of these peaks showed good performance. Furthermore, biofilm composition analysis yielded no statistically significant peaks that met the selection criteria.

4. Discussion

Rapid identification and antibiotic resistance detection of etiological agents are crucial for accurate antimicrobial treatment and reduced patient mortality rate [15]. In the present study, we found two potential biomarker peaks (8975 and $9035 m/z$), which allowed the discrimination of methicillin-resistant *S. hominis* isolates. The presence of the

Table 1

Description of potential biomarker peaks of methicillin resistance and subspecies differentiation in *Staphylococcus hominis*.

Methicillin resistance phenotype	Potential biomarker peak (m/z)	Protein	Mascot score	Protein sequence coverage (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Methicillin								
Not susceptible	8975^+	UPF0060 membrane protein SH0717	38	74.00	96.72	45.83	90.08	73.33
Susceptible	9035^+	30S ribosomal protein S12	36	59.00	96.72	45.83	90.08	73.33
Not susceptible	$8975^+/9035^-$	NA	NA	NA	97.52	45.83	90.08	78.57
Subspecies								
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	2619^+	DNA gyrase subunit A (Fragment)	19	23.00	98.28	100	100	94.74
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	2582^+	UPF0358 protein USA300HOU_1050	18	24.00	88.89	100	100	96.70
	2823^+	Phosphocarrier protein HPr	18	29.00	88.89	87.93	69.57	96.23

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value, +: present, -: absent, NA: not applicable.

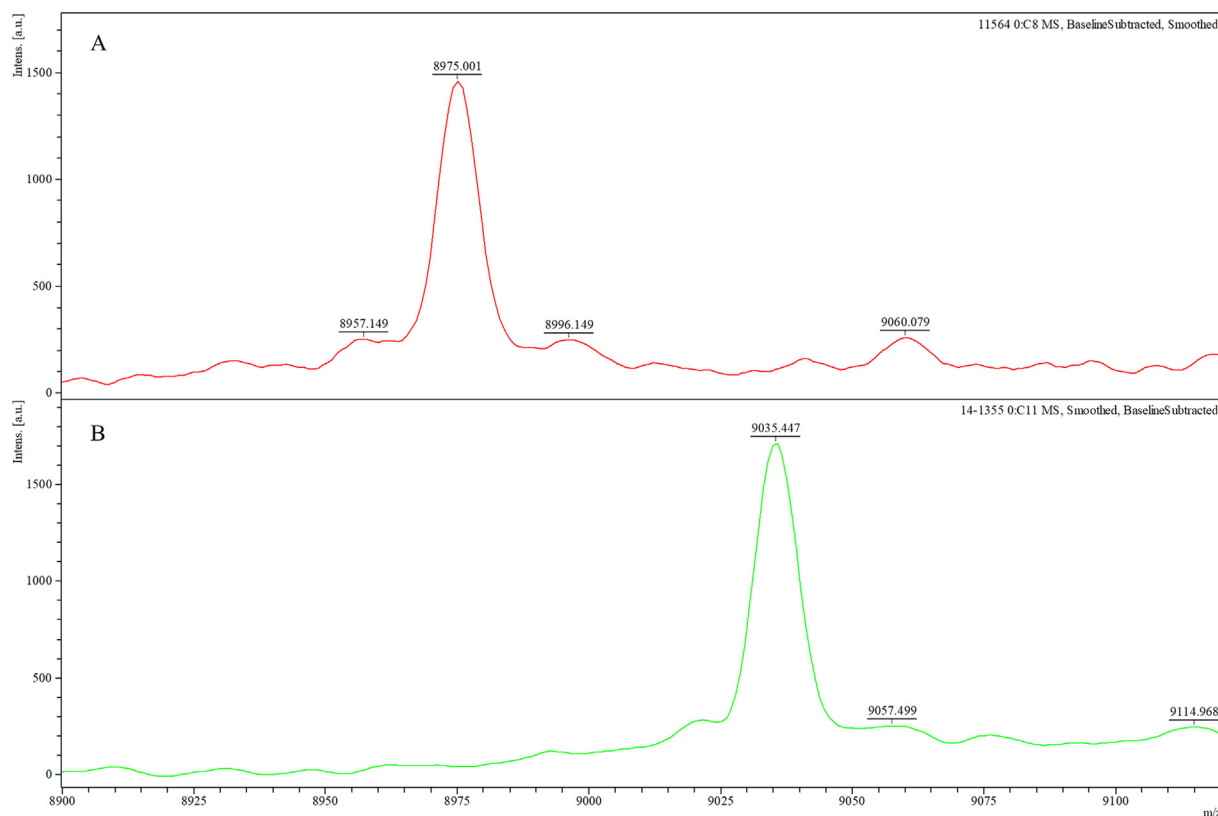


Fig. 3. Representative mass spectra of peaks 8975 and $9035 m/z$ in *S. hominis*. The peak $8975 m/z$ is present, and the peak $9035 m/z$ is absent in not susceptible methicillin isolates (a) whereas the peak $8975 m/z$ is absent, and the peak $9035 m/z$ is present in susceptible methicillin isolates (b). The red line denotes not susceptible isolates whereas the green line denotes susceptible isolates.

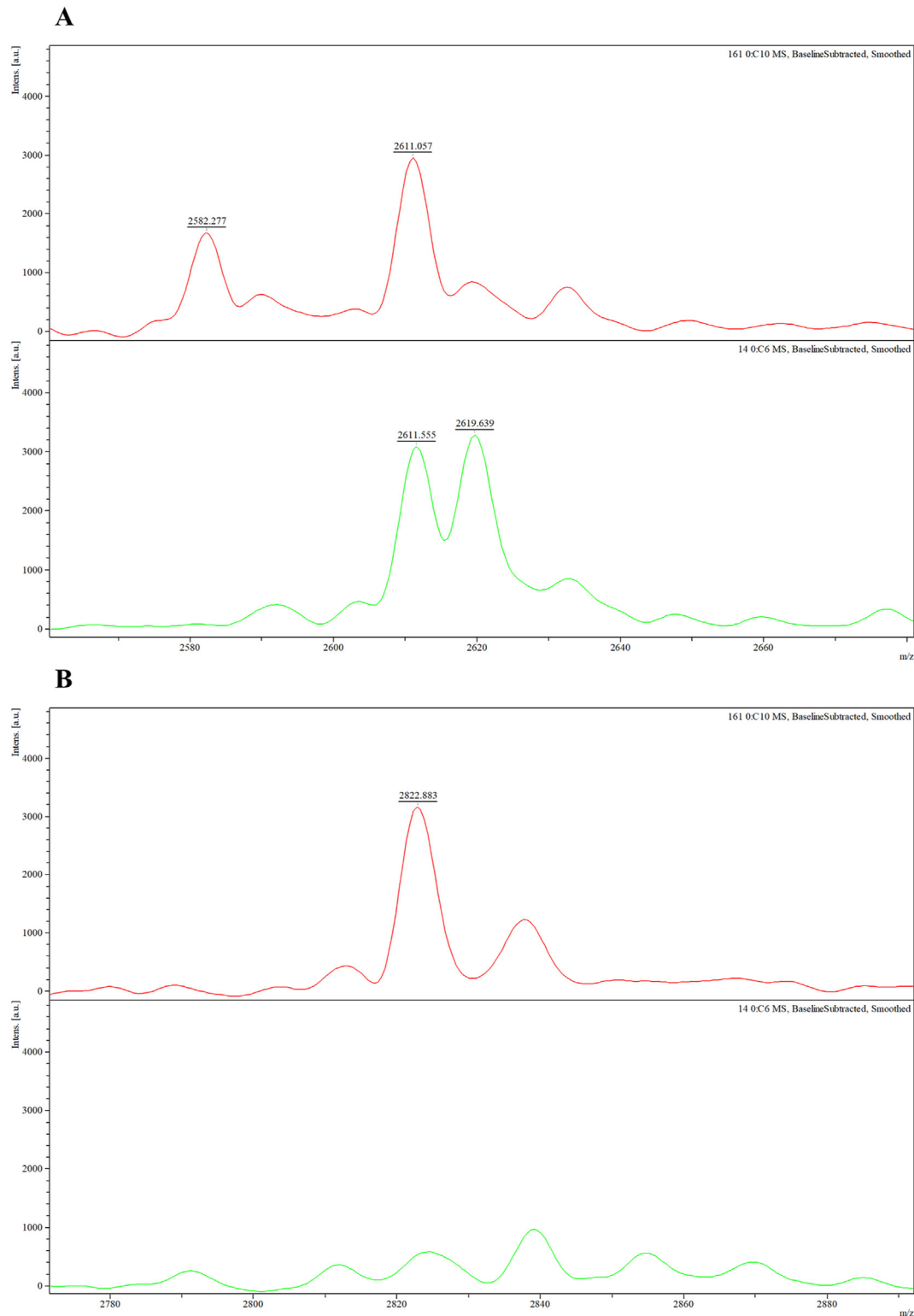


Fig. 4. Mass spectra of peaks in *S. hominis* subspecies. (A) The peak 2582 m/z was present in SHN and absent in SHH isolates whereas the peak 2619 m/z was present in SHH and absent in SHN isolates. (B) The peak 2823 m/z was present only in SHN and absent in SHH isolates. The red line denotes SHN isolates whereas the green line denotes SHH isolates.

8975 m/z peak and the absence of the 9035 m/z peak in non-susceptible isolates were associated with a methicillin resistance phenotypic profile (sensitivity of 96.72%). The protein associated with the 8975 m/z peak was the UPF0060 membrane protein SH0717 of *Staphylococcus haemolyticus*. Members of the UPF0060 families are helicoidal transmembrane proteins associated with thallium resistance acting as efflux pumps in

Pseudomonas fluorescens, *Cupriavidus brasiliensis*, *Sphingomonas koreensis*, and *Caulobacter crescentus* [16]. The 9035 m/z associated protein was the 30S ribosomal protein S12 of *Staphylococcus aureus*. This protein plays a role in the ribosome assisting in the interaction with the tRNA in the translation process [17]. Several protein biomarkers of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) have been previously reported

[18, 19], some of these were specific to either MRSA or methicillin-susceptible isolates. A peak was previously identified to be a fragment of the altered penicillin-binding protein (PBP2a), which is known to be associated with methicillin resistance. In normal conditions, this protein is involved in bacterial peptidoglycan biosynthesis [20]. No reports of the presence of the 8975 m/z peak and the absence of the 9035 m/z peak in any staphylococcal species have been shown. Further experiments are needed to confirm the association of these peaks with methicillin resistance, but its association with *S. hominis* may predict methicillin resistance.

We found three potential protein marker peaks for rapid differentiation of SHN isolates. For the SHN, the peak 2582 m/z was associated with UPF0358 protein USA300HOU_1050 which was associated with Phosphocarrier protein HPr. The peak 2619 m/z for SHH subspecies was correlated with DNA gyrase subunit A (Fragment). Our results differ from a previous study where they found similar m/z peaks 2559.085 m/z and 2612.672 m/z. These peaks were present in 100% of SHH and SHN isolates, respectively [21]. Subspecies-level identification may require additional modification to the methodology analysis to increase precision.

Most of the isolates analyzed in this study (77.7%) were biofilm producers, and up to 65% were strong producers. The biofilm formation of *S. hominis* is diverse. Some reports showed low [22] to no biofilm production [23]. However, in recent studies, biofilm-producing clinical *S. hominis* isolates have been increasing, with frequencies up to 90.0% (5, 6). As biofilm production has been associated with greater virulence and more difficult eradication mainly in bloodstream infections [24], these results highlight the importance of biofilm determination in infection management, since bacteria in biofilm become tolerant and resistant to antibiotics an efficient treatment in biofilm infections is a multipath way process, which may include removal infected indwelling medical devices, administrating high dosage alone or in combinations of antibiotics, and selecting from limited options a biofilm-active, sensitive and well-penetrating antibiotics [25]. Because biofilm formation is a multi-pathway process, it is difficult to associate a biomarker for its synthesis or composition. Indeed, we did not find any biomarker peak with adequate performance to predict biofilm formation.

The biofilm matrix is composed of extracellular polysaccharides, DNA, proteins, and lipids, the proportion of which varies among bacteria [26]. We found heterogeneous biofilm formation between the *S. hominis* isolates, and the primary biofilm component was proteins with > 80% of detachment, which agreed with previous reports where they found similar detachment values for proteins when *S. hominis* biofilm was treated with proteinase k [5, 6]. Szcuka and colleagues reported that proteins and polysaccharides were the major components of the extracellular matrix of the biofilm formed by *S. hominis* [6]. Our strains did not have polysaccharides as their main biofilm component, only eleven isolates (9.5%) have similar proteins and polysaccharides detachment values > 80%. This difference may be due to the site of infection, as clinical specimens differed among studies; all our strains were isolated exclusively from blood and cerebrospinal fluid. Regardless of this, the polysaccharide intercellular adhesin and the poly-N-acetyl glucosamine polymer depend on the *ica* locus for their synthesis [27], which has been reported to have a high frequency in *S. hominis* strains [5, 6]. By contrast, the primary components of biofilm in *Staphylococcus lugdunensis* are proteins instead of carbohydrates [28]. These results suggest that biofilm composition is highly heterogeneous in the CoNS group and that proteins play a structural role in the biofilm.

S. hominis isolates were highly resistant to oxacillin, ciprofloxacin, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycin, and azithromycin (>50%). A low percentage of linezolid (3.4%) and vancomycin (0%) resistance was detected, which is expected as these are last-resort antibiotics. Low linezolid resistance in *S. hominis* has been previously reported [2, 3]. All isolates have 100% agreement with the *mecA* gene presence or absence for methicillin-resistant and susceptible isolates, respectively. Altogether, these results enforce the need to monitor

drug susceptibility, especially as *S. hominis* is one of the top three causative agents of bloodstream infections [29, 30].

This study has a few limitations. Subspecies classifications were based on phenotypic methods using the novobiocin test. Our results are based on the protein profile previously obtained through conventional identification using an established procedure. The conventional methodology generates protein spectra of sufficient quality to identify bacterial species, but it is generally inadequate to recognize subgroups therein, such as resistant phenotypes. Therefore, further studies are needed on specific variables, for example, different protein extraction methodologies, matrix options, and other parameters of MS software analyses to obtain better quality spectra. The frequency of the *ica* gene in the *S. hominis* isolates should also be determined to compare the biofilm composition of each isolate. Genetic typing should also be performed to determine if the peaks related to methicillin-resistant isolates are clone specific even though has been reported low clonality rates in *S. hominis* isolates. Finally, studies of external validation with another set of isolates should be performed, including not only clinical but also environmental or contaminant isolates.

5. Conclusion

We found two potential biomarker peaks to predict methicillin resistance and three potential marker peaks to identify *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* using the conventional identification procedure in MALDI-TOF MS. This method allows shortening time between bacterial identification, testing, and reporting antimicrobial resistance with no additional methods to conventional MALDI-TOF MS methodology identification, which is critical for an early and specific selection of drug treatment.

Funding information

This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación para la Educación of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) under Grant [number A1-S-16392].

CRediT author statement

Verónica Villarreal-Salazar: Investigation, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Soraya Mendoza-Olazarán:** Conceptualization, Visualization, Supervision, Writing - Original Draft. **Samantha Flores-Treviño:** Conceptualization, Visualization, Supervision, Writing - Original Draft. **Paola Bocanegra-Ibarias:** Resources, Writing - Review & Editing. **Elvira Garza-González:** Resources, Writing - Review & Editing. **Rayo Morfín-Otero:** Resources, Writing - Review & Editing. **Eduardo Rodríguez-Noriega:** Resources, Writing - Review & Editing. **Adrián Camacho-Ortiz:** Resources, Writing - Review & Editing, Founding acquisition. **Licet Villarreal-Treviño:** Conceptualization, Visualization, Supervision, Writing - Original Draft.

Declaration of competing interest

No conflict of interest declared.

Acknowledgements

We wish to thank to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the founding.

References

- [1] Chaves F, Garcia-Alvarez N, Sanz F, Alba C, Otero JR. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4877-9.
- [2] de Almeida LM, de Araújo MRE, Sacramento AG, Pavez M, de Souza AG, Rodrigues F, et al. Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is

- associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(8):4082–3.
- [3] Sorlozano A, Gutierrez J, Martinez T, Yuste ME, Perez-Lopez JA, Vindel A, et al. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29(1):73–80.
- [4] Szczuka E, Makowska N, Bosacka K, Slotwinska A, Kaznowski A. Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens. *Folia Microbiol* 2016;61(2):143–7.
- [5] Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Villarreal-Trevino L, Rodriguez-Noriega E, Llaca-Diaz J, Camacho-Ortiz A, et al. Antibiotic susceptibility of biofilm cells and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS One* 2015;10(12):e0144684.
- [6] Szczuka E, Telega K, Kaznowski A. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)* 2015;60(1):1–5.
- [7] Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015;6(791).
- [8] Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(11):1626–30.
- [9] Wesley E, Kloos CGG, Olgiate Jennifer S, Van Pelt Linda, McKinnon Mary L, Zimmer Barbara L, Muller Eugene, Melvin P, Weinstein, Mirrett Stanley. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:799–812.
- [10] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- [11] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22(6):996–1006.
- [12] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility that grow aerobically. M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
- [14] Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5026–33.
- [15] Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol* 2018;9(1097).
- [16] Price MN, Wetmore KM, Waters RJ, Callaghan M, Ray J, Liu H, et al. Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature* 2018;557(7706):503–9.
- [17] Held WA, Gette WR, Nomura M. Structure and function of bacterial ribosomes. 24. Role of 16S ribosomal ribonucleic acid and the 30S ribosomal protein S12 in the initiation of natural messenger ribonucleic acid translation. *Biochemistry* 1974;13(10):2115–22.
- [18] Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000;49(3):295–300.
- [19] Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;86(3):257–61.
- [20] Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30(5):673–91.
- [21] Pereira EM, de Mattos CS, Dos Santos OC, Ferreira DC, de Oliveira TLR, Laport MS, et al. *Staphylococcus hominis* subspecies can be identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS profiles. *Sci Rep* 2019;9(1):11736.
- [22] Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Martinez-Vazquez MA, Gonzalez-Diaz E, Gonzalez-Santiago O, Rodriguez-Noriega E. Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus sciuri*. *Scand J Infect Dis* 2011;43(11–12):930–6.
- [23] de Allori M, iacute a Cristina G, Jure M, iacute Aacute, et al. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Biol Pharm Bull* 2006;29(8):1592–6.
- [24] Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78(3):510–43.
- [25] Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* 2015;7(1):1–7.
- [26] Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(5):877–86.
- [27] Otto M. Staphylococcal biofilms. *Bacterial Biofilms* 2008;322:207–28.
- [28] Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun* 2007;75(10):4728–42.
- [29] Roy P, Ahmed NH, Biswal I, Grover RK. Multidrug-resistant *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* causing septicemia in patients with malignancy. *Indian J Pathol Microbiol* 2014;57(2):275–7.
- [30] Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Llaca-Diaz J, Flores-Trevino S, Gonzalez-Gonzalez GM, et al. Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS One* 2013;8(4):6.

Basel, 9th May 2019

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2019

We hereby confirm that the following abstract was submitted, accepted and presented at the 29th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which took place in Amsterdam, Netherlands, 13 – 16 April 2019.

Title: Novel biomarker mass peaks for rapid identification of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* by MALDI-TOF MS

Abstract Authors: V. Villarreal Salazar, S. Mendoza-Olazarán, E. Garza Gonzalez, L. Villarreal-Treviño, M. Del Rayo Morfin-Otero, A. Camacho-Ortiz, S. Flores-Treviño

Presenter: Elvira Garza Gonzalez

Session Title: Applications of mass spectrometry

Presentation Type: Paper Poster Session

Presentation Number: P0433

Yours sincerely,



Winfried V. Kern
ECCMID 2019 Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID Executive Committee: J. Rodriguez-Banõ, President, Seville, ES; M. Poljak, Immediate Past-President and Publications Officer, Ljubljana, SI; M. Sanguinetti, President-elect and Secretary General, Rome, IT; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, NL; E. Cambau; Professional Affairs Officer, Paris, FR; E. Tacconelli, Guidelines Officer, Verona, IT; A. Zinkernagel, Scientific Affairs Officer, Zurich, CH; Ö. Ergönül, Education and Communications Officer, Istanbul, TR; Ad hoc Members: Ch. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, SE; L. Scudeller, ESCMID Guidelines Director, Pavia, IT; L. Leibovici, *CMJ* Editor-in-Chief, Petah-Tiqva, IL; W. Kern, ECCMID Programme Director, Freiburg, DE



Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

Constancia

a

VERÓNICA VILLARREAL SALAZAR

Por haber participado como **PONENTE** con el trabajo titulado "Marcadores proteicos de biofilm en las subespecies de *Staphylococcus hominis* por MALDI-TOF MS" dentro de la sesión de carteles, durante el **XLIV CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA** celebrado en León, Guanajuato, México, del 22 al 25 de mayo de 2019.

Autores:

Verónica Villarreal Salazar, Soraya Mendoza Olazarán, Licet Villarreal Treviño, Paola Bocanegra Ibarias, Rayo Morfín Otero, Adrián Camacho Ortiz, Eduardo Rodríguez Noriega, Elvira Garza González, Samantha Flores Treviño

Dr. José Juan Donís Hernández
Presidente de la AMIMC A.C.

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretaria Académica, AMIMC A.C.

Basel, 5th August 2021

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2021

We hereby confirm that the following abstract was submitted, accepted and presented at the 31st ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, that took place online from 9 – 12 July 2021.

Title: Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in biofilm cells of *Staphylococcus hominis* clinical isolates

Abstract Authors: Verónica VILLARREAL-SALAZAR (1), Licet VILLARREAL-TREVIÑO (1), Paola BOCANEGRA-IBARIAS (2), Elvira GARZA-GONZÁLEZ (2), Rayo MORFIN-OTERO (3), Eduardo PÉREZ-ALBA (2), Adrián CAMACHO-ORTIZ (2), Samantha FLORES-TREVIÑO (2) - (1)Laboratorio de Microbiología General, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico, (2)Servicio de Infectología, Hospital Universitario “Dr. José E. González”, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico, (3)Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Mexico

Presenter: Veronica Villarreal-Salazar

Session Title: 9c. Preclinical biofilm studies

Presentation Type: ePosters

Abstract / Presentation Number: 2573

Yours sincerely,



Jacob Moran-Gilad
ECCMID Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

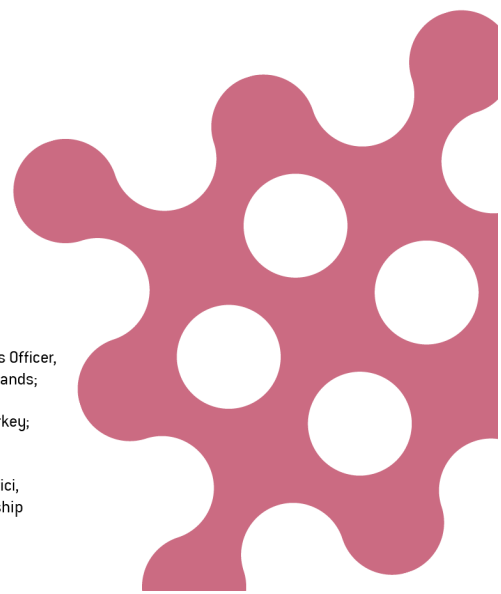
ESCMID Executive Committee: M. Sanguinetti, President, Rome, Italy; J. Rodríguez-Baño, Immediate Past-President and Guidelines Officer, Seville, Spain; A. Zinkernagel, President-elect and Secretary General, Zurich, Switzerland; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, Netherlands; E. Cambau, Professional Affairs Officer, Paris, France; J. S. Friedland, Scientific Affairs Officer, London, United Kingdom; Ö. Ergönül, Communications and Publications Officer, Istanbul, Turkey; R. L. Skov, Education Officer, Copenhagen, Denmark

Ad hoc Members: C. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, Sweden; L. Scudeller, ESCMID Guidelines Director, Pavia, Italy; L. Leibovici, CMI Editor-in-Chief, Petah-Tiqva, Israel; J. Moran-Gilad, ECCMID Programme Director, Beer Sheva, Israel; M. Akova, ESCMID Membership Counsellor, Ankara, Turkey;

Online
9 – 12 July 2021

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

31st **ECCMID**



La Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA



Por la presentación de Trabajo Libre en la categoría Investigación básica

Título: Efecto de concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre el biofilm de aislamientos clínicos de *Staphylococcus hominis*

Autor (es): Verónica Villarreal Salazar

Coautor (es): Licet Villarreal Treviño, Paola Bocanegra Ibarias, Elvira Garza González, Rayo Morfin Otero, Eduardo Pérez Alba, Adrián Camacho Ortiz, Samantha Flores Treviño

Durante el

XLV CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Realizado del 28 de mayo al 4 de junio del 2021 en modalidad virtual.

Dr. José Juan Donis Hernández
Presidente AMIMC

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretario Académico

XLVI

Congreso Nacional
de Infectología y
Microbiología Clínica

del 25 al 28
de Mayo de 2022

LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INFECTOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA A.C.,
otorga la presente constancia

Por la presentación del trabajo libre



"Estandarización de la susceptibilidad a antibióticos en células de biopelícula de Staphylococcus hominis"

en la categoría Investigación Básica

Autor (es): Verónica Villarreal Salazar

Coautor (es): Paola Bocanegra Ibarias, Licet Villarreal Treviño, Daniel Salas Treviño, Rayo Morfin Otero, Adrián Camacho Ortiz, Samantha Flores Treviño

dentro de la sesión de carteles, durante el XLVI CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA celebrado del 25 al 28 de mayo del año en curso en el Centro de Convenciones de San Luis Potosí, SLP.


Dra. Fernanda González Lara
Secretaria Académica
Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica AC


Dr. Gerardo Martínez Aguilar
Presidente
Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica AC

XLVI

Congreso Nacional
de Infectología y
Microbiología Clínica

del 25 al 28
de Mayo de 2022

LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INFECTOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA A.C.,
otorga la presente constancia

Por la presentación del trabajo libre



"Concentraciones subinhibitorias de antibióticos modifican la formación de biopelícula de aislamientos clínicos de Staphylococcus hominis"

en la categoría Investigación Básica

Autor (es): Verónica Villarreal Salazar

Coautor (es): Licet Villarreal Treviño, Paola Bocanegra Ibarias, Daniel Salas Treviño, Rayo Morfín Otero, Adrián Camacho Ortiz, Samantha Flores Treviño

dentro de la sesión de carteles, durante el XLVI CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA celebrado del 25 al 28 de mayo del año en curso en el Centro de Convenciones de San Luis Potosí, SLP.


Dra. Fernanda González Lara
Secretaria Académica
Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica AC


Dr. Gerardo Martínez Aguilar
Presidente
Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica AC

La Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León

Otorga el presente

Reconocimiento

Verónica Villarreal Salazar, Licet Villarreal Treviño,
Soraya Mendoza Olazarán, Rayo Morfín Otero,
Elvira Garza González

A:

Por su participación con el **Trabajo de Investigación** en el:

«22 Encuentro Estatal de Investigación en Salud 2019»

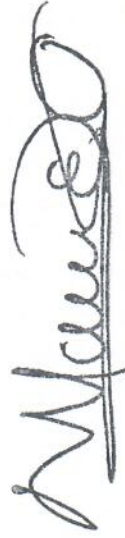
en la Categoría de Investigación en Ciencias Básicas; con el Trabajo

«Efecto de Concentraciones Subinhibitorias de Antibióticos en la Composición y

Producción del Biofilm de *Staphylococcus Hominis*»

Obteniendo el **TERCER LUGAR**

22 y 23 de Octubre, 2019



Dr. Manuel Enrique de la O Cavazos
SECRETARIO DE SALUD
DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
DIRECTOR DE ENSEÑANZA,
INVESTIGACIÓN EN SALUD Y CALIDAD