

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**Análisis del efecto antimicrobiano de las soluciones sello de gentamicina/heparina y gentamicina/citrato en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa***

**Por:**

**Dra. Arantxa Natiluz Rodríguez**

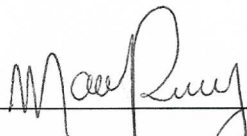
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE**

**ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

**DICIEMBRE 2023**

**Análisis del efecto antimicrobiano de las soluciones selló de  
gentamicina/heparina y gentamicina/citrato en aislamientos clínicos de  
*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa***

Aprobación de la tesis:



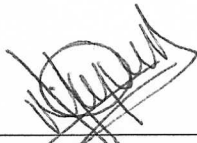
---

Dra. María Teresa Ramírez Elizondo  
Directora de tesis



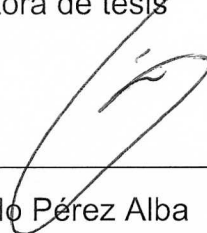
---

Dr. C. Daniel Salas Treviño  
Co-director de tesis



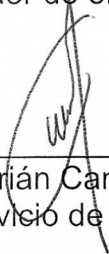
---

Dra. Magaly Padilla Orozco  
Co-directora de tesis



---

Dr. Eduardo Pérez Alba  
Coordinador de enseñanza



---

Dr. med. Adrián Camacho Ortíz  
Jefe del Servicio de Infectología



---

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco y dedico esta tesis al mayor maestro de todos, Dios, por guiarme hasta aquí y brindarme la energía y paciencia necesaria para culminar esta etapa. A mis padres, Nelson Rodríguez y Yurnia Rodríguez, por siempre ser un ejemplo de constante dedicación en sus vidas, desde lo profesional y lo personal, pero sobre todo por enseñarme que este es un camino de vocación y sacrificio, son mi apoyo incondicional. A mi hermana, Aziyadeh Rodríguez, por sus largas horas escuchándome y apoyándome en este proceso a pesar de la distancia.

A mis profesores, por ser guías en este proceso de formación, por brindarnos el ánimo persistente del estudio y principalmente enseñarnos siempre a mantener un trato humano con los pacientes y el personal de salud que trabaja en conjunto con nosotros. A todo el equipo en general del Servicio de Infectología por la paciencia y tolerancia en los pasos iniciales de formación y aprendizaje, siempre han estado presentes. A todos mis compañeros de residencia, nos mantuvimos unidos y logramos adecuado equilibrio. A todos y cada uno de los pacientes, sin ellos el fin de todo esto no tendría sentido. Por último y no menos importante a mí misma, que nunca he olvidado el por qué empecé y a pesar de los tropiezos lo he logrado.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	19
VARIABLES.....	20
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIÓN.....	37
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	38

## INDICE DE TABLAS, GRÁFICAS E IMÁGENES

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Criterios de Stepanovic para clasificación de producción de biopelícula...14	14
Tabla 2. Variables y definición operacional.....20	20
Tabla 3. Categorización de la formación de biopelícula.....24	24
Tabla 4. CMI, CMIB y CMEB de G-H, G-C y G.....27	27
<b>Gráficos</b>	
Gráfico 1. Distribución y elección de cepas.....23	23
Gráfico 2. CMI <i>in vitro</i> de las células planctónicas .....25	25
Gráfico 3. CMIB vs CMEB de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .....29	29
Gráfico 4. Efecto antimicrobiano en catéteres de HD.....31	31
<b>Imágenes</b>	
Imagen 1. Formación de biopelícula de cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....23	23
Imagen 2. Formación de biopelícula de cepas de <i>S. aureus</i> ..... 24	24
Imagen 3. Erradicación de biopelícula con diluciones seriadas de G.....30	30
Imagen 4. Erradicación de biopelículas con diluciones seriadas de G-H.....30	30
Imagen 5. Erradicación de biopelículas con diluciones seriadas de G-C.....31	31
Imagen 6. Colonias de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dilución 1:10.....32	32
Imagen 7. Colonias de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dilución 1:1,000.....32	32
Imagen 8. Cultivo de catéter de HD sonicado sin crecimiento.....33	33

## ABREVIATURAS

- ATCC:** American Type Culture Collection.
- BACHD:** bacteriemia asociada a catéter de hemodialisis.
- BACVC:** bacteriemia asociada a catéter venoso central.
- CDC:** Centro para el Control y Prevención de Enfermedades.
- CLSI:** Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio.
- CMI:** concentración mínima inhibitoria.
- CMIB:** concentración mínima inhibitoria de biopelícula.
- CMEB:** concentración mínima erradicadora de biopelícula.
- CVC:** catéter venosos central.
- DO:** densidad óptica.
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.
- ERC:** enfermedad renal crónica.
- G:** solución sello de gentamicina.
- G-C:** solución sello de gentamicina/citrato.
- G-H:** solución sello de gentamicina/heparina.
- HD:** hemodiálisis.
- IAAS:** infecciones asociadas a la atención de la salud.
- IAC:** infecciones asociadas a catéter.
- MH:** caldo Mueller-Hinton.
- TRR:** terapia de reemplazo renal.
- TSA:** agar Soya Tripticasa.
- TSB:** caldo Soya Tripticasa

**UCI:** unidad de cuidados intensivos.

**UFC:** unidades formadoras de colonias.

**USD:** dólares estadounidenses.

## RESUMEN

La bacteriemia asociada a catéter de hemodialisis (BACHD) es de las principales causas de morbilidad en hemodiálisis. Para su prevención han surgido nuevas estrategias como el uso de soluciones sello antisépticas o antibióticas.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto antimicrobiano de las soluciones sello de gentamicina/heparina (G-H), gentamicina/citrato (G-C) y gentamicina (G) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* de aislamientos clínicos de infecciones asociadas a catéter (IAC).

Se analizaron 2 cepas provenientes de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y de *S. aureus*, además las cepas control *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213. El 100% de las cepas analizadas de IAC fueron productoras de biopelícula. No hubo diferencias en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de células planctónicas de G-H (4 µg/mL - 2 UI/mL) y G-C (4 µg/mL - 0.06%). En cuanto a la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB) G-H requirió mayor concentración (2,048 µg/mL- 1000 UI/mL) versus G-C (1,024 µg/mL - 16%), contrario a lo observado con la concentración mínima erradicadora de biopelícula (CMEB) donde G-C obtuvo concentraciones más elevadas. Todas las soluciones sello lograron erradicar la biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC 27853 *in vitro* en el catéter de HD.



Como se ha observado en otros estudios, las soluciones selló con gentamicina han logrado reducir la BACHD. *In vitro* tanto G-H como G-C lograron inhibir y erradicar la biopelícula de *P. aeruginosa* y de *S. aureus*. Poder definir la concentración y cual combinación es mejor (G-H versus G-C) aún está en investigación, sin embargo, en este estudio se define cuales dosis podrían utilizarse en estas soluciones selló.

## ANTECEDENTES

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) se presentan en los pacientes al recibir servicios médicos en centros de salud u hospitales. (1) Dentro de las IAAS se incluyen bacteriemias asociadas a catéter, infecciones del tracto urinario asociado a catéter, neumonía asociada a ventilador e infecciones del sitio quirúrgico. Regularmente se presentan después de las primeras 48 horas del internamiento y dentro de un lapso de 30 días a partir de recibir servicios de salud. (2)

La bacteriemia asociada a catéter venoso central (BACVC) es una de las IAAS con mayor relevancia clínica a nivel mundial. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), alrededor de 80,000 BACVC ocurren en las unidades de cuidados intensivos (UCI) cada año y alrededor de 250,000 casos si se evaluaran todas las áreas de los hospitales. (3) La tasa de BACVC en UCI es de aproximadamente 25.6%, sin embargo, puede cambiar dependiendo de factores como el sitio de inserción del catéter venoso central (CVC), el centro de atención hospitalaria y el crecimiento socioeconómico del país, siendo más frecuente en países en vías de desarrollo. (4)

Estos mismos factores de riesgo se aplican a las bacteriemias asociadas a catéter de hemodiálisis (BACHD). Una práctica diaria en pacientes hospitalizados por enfermedad renal crónica (ERC) para facilitar la terapia de reemplazo renal (TRR), es el uso de CVC para terapia de hemodiálisis (HD)

urgente o colocación de catéteres tunelizados. El 15% de los estadounidenses y 14% de los hispanos tienen ERC y cada 24 horas alrededor de 360 pacientes inician tratamiento de diálisis por insuficiencia renal. (5) Reportes estiman que en México para el 2014, el gasto de salud anual medio por persona con esta condición fue de 8,966 dólares estadounidenses (USD) en la Secretaría de Salud y de 9,091 USD en el Instituto Mexicano del Seguro Social. (6) Un estudio describió las principales causas de morbilidad en pacientes en HD en México, siendo infección del acceso vascular la segunda causa más frecuente (34%) luego de síndrome anémico (45%). (7) Aproximadamente 28% de los pacientes que se encuentran en HD estarán colonizados por 1 o más bacterias resistentes y 16% por bacilos Gram negativos multidrogosresistentes. (8)

Las tasas de BACHD en catéter tunelizado va de 0.5-5.5/1,000 días-catéter y en no tunelizado de 3.8-12.8/1,000 días-catéter. La incidencia aumenta con el tiempo y cuando son colocados en vena femoral. (9) En el caso del catéter tunelizado, las complicaciones infecciosas se presentan mayormente entre los 3 a 6 meses de colocado. (10)

Los síntomas varían desde malestar general, fiebre, escalofríos e hipotensión, hasta alteración del estado de conciencia sin otra causa aparente. El manejo puede ser ambulatorio en las sesiones de HD o requerir de hospitalización. (10) De igual forma, el retiro del catéter es necesario en casi 1 de cada 5 personas con BACHD. (9)

Las medidas más recomendadas para la prevención de BACHD incluyen el entrenamiento del personal de salud sobre la colocación del catéter con uso de técnica estéril antes y durante la colocación, uso de clorhexidina con alcohol como antiséptico de la piel y el uso de apósito o almohadilla de gel de gluconato de clorhexidina para cubrir el catéter. No obstante, a pesar de estas medidas, su incidencia va incrementándose, requiriendo nuevas estrategias. Por ello, surge el uso de soluciones sello antisépticas o antibióticas. (3)

Estos sellos consisten en la instilación de altas concentraciones de soluciones antisépticas, antibióticas o combinadas. En el caso de sellos con antibiótico, se utiliza una dosis de hasta 1,000 veces su concentración mínima inhibitoria (CMI) y permaneciendo en el catéter entre 12 a 24 horas para erradicar los microorganismos y prevenir la formación de biopelícula. (11, 12)

La biopelícula es una matriz de sustancia polimérica extracelular con colonias de microorganismos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que funciona como una especie de hábitat controlado. (13) Su desarrollo ocurre en la superficie o en el espacio intraluminal de los catéteres resultando en infecciones locales o en bacteriemias asociadas a catéter, respectivamente. Los principales patógenos causantes de estas infecciones provienen de la microbiota de la piel, siendo más frecuentes los Gram positivos (entre ellos *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Staphylococcus aureus*), seguido de Gram negativos como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y por último hongos como *Candida spp.*

(14, 15, 16) Sin embargo, en la actualidad se observa un aumento en los casos reportados por bacterias Gram negativas. (17)

Las principales soluciones sello empleadas son la heparina, solución salina y etanol. (12) En distintos estudios, también se maneja el uso de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y citrato trisódico, de forma individual o en combinación con antibióticos. (18) En estudios de metaanálisis publicados recientemente, se evidenció que el uso de sellos con antimicrobianos que incluían cefotaxima, cloxacilina, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina, linezolid, minociclina, taurolidina, vancomicina y etanol fueron superiores en comparación al uso individual de heparina 5,000 U/mL para prevenir BACHD. (19)

Dependiendo de la naturaleza de la bacteria que se desea evitar debe ser el espectro de los antibióticos elegidos. (20) Se observó en una revisión de Cochrane del 2021 que soluciones combinadas con vancomicina, amikacina o taurolidina más heparina, redujeron el riesgo de infecciones asociadas a CVC por bacterias Gram positivas. (21) El uso de soluciones sello de vancomicina/heparina o daptomicina/heparina también demostró que disminuye la formación de biopelícula *in vitro* por *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativo, en comparación con la heparina. (22)

En cuanto a las bacterias Gram negativas, las soluciones sello de aminoglucósidos más heparina o citrato y combinaciones con otros

antimicrobianos son los más estudiados. (20) En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, se reportó una reducción en el promedio de casos de bacteriemia asociada a catéter por 1,000 catéteres-días de 1.28 casos a 0.2 casos después de usar soluciones sello de gentamicina/heparina. En dicho estudio, la reducción fue principalmente en las infecciones causadas por Gram negativos (*P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) y una disminución de 37.5% por *S. aureus*. (9)

Otro estudio publicado en 2012 demostró que la combinación de gentamicina/EDTA cada 24 horas por 5 días logró la erradicación en la formación de biopelícula tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas. (23) De igual manera, en el 2020 un estudio realizado en pacientes en HD, conjugó gentamicina/citrato como solución sello, evidenciándose reducción del 70% de las BACHD generando un ahorro anual por las hospitalizaciones evitadas de 332, 418 USD, es decir 1,553 USD por paciente. (24) Hasta el momento, la mayoría de los estudios comparan gentamicina/citrato con heparina, o gentamicina/heparina con heparina o citrato, sin embargo, no se ha analizado y comparado ante las mismas cepas bacterianas soluciones sello de gentamicina/heparina versus gentamicina/citrato. Al igual que no se ha definido la concentración ideal de estas soluciones sello en los catéteres de pacientes en HD durante la práctica clínica que reduzcan la incidencia de BACHD.

## HIPÓTESIS

### **Hipótesis alternativa**

Las soluciones sellado de gentamicina/heparina, gentamicina/citrato y gentamicina tienen efecto antimicrobiano sobre la formación de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### **Hipótesis nula**

Las soluciones sellado de gentamicina/heparina, gentamicina/citrato y gentamicina no tienen efecto antimicrobiano sobre la formación de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

## OBJETIVOS

### Objetivo primario

- Analizar el efecto antimicrobiano de las soluciones sello de gentamicina/heparina, gentamicina/citrato y gentamicina en cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* de aislamientos clínicos de infecciones asociadas a catéter (IAC).

### Objetivos secundarios

- Categorizar la formación de biopelícula de cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* de aislamientos clínicos de IAC.
- Determinar la CMI *in vitro* de las células planctónicas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* tratadas con las soluciones sello de gentamicina/heparina, gentamicina/citrato y gentamicina.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de la biopelícula (CMIB) y la concentración mínima erradicadora de biopelícula (CMEB) *in vitro* de *P. aeruginosa* y *S. aureus* tratadas con las soluciones sello de gentamicina/heparina, gentamicina/citrato y gentamicina.
- Identificar el efecto antimicrobiano de las soluciones sello en un modelo de crecimiento de biopelícula en catéteres de hemodiálisis no tunelizados.



## JUSTIFICACIÓN

La BACHD es un problema de salud pública y el papel que desempeña la biopelícula en esta entidad patológica es relevante. Una de las medidas preventivas más importantes para evitar la BACHD son las soluciones sello. Por tanto, es relevante determinar y comparar el efecto antimicrobiano así como optimizar las concentraciones de las soluciones sello de gentamicina/heparina y gentamicina/citrato sobre la formación de biopelícula de los agentes bacterianos que frecuentemente se aíslan de catéteres de HD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del estudio y población

Este es un estudio analítico y experimental. Para el desarrollo de los distintos experimentos se utilizaron 2 cepas provenientes de aislamientos clínicos de IAC de *P. aeruginosa*, 2 cepas de aislamientos clínicos de IAC de *S. aureus* y 1 cepa de la American Type Culture Collection (ATCC) de cada especie bacteriana. Se realizó una prueba piloto para la validación de las cepas ATCC productoras de biopelícula y obtener las cepas provenientes de aislamientos clínicos de IAC.

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio del Servicio de Infectología, ubicado en el segundo piso del edificio AEMA, del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Los aislamientos clínicos fueron recuperados de hemocultivos entre el período de 2019 – 2023 y fueron desarrolladas en agar Soya Trypticase (TSA) con incubación a 35°C. Posteriormente, las bacterias se resguardaron en crioviales para congelación a -70°C en caldo Soya Trypticase (TSB) con 15% de glicerol hasta su uso en este proyecto. Los crioviales fueron descongelados a temperatura ambiente y posteriormente fueron cultivados en TSA a 35°C.

La identificación de los aislamientos se realizó mediante espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) siguiendo las especificaciones del fabricante. Una colonia de la cepa crecida en TSA a 35°C fue transferida mediante un palillo de

madera hacia una placa de acero inoxidable de 96 puntos (Bruker Daltonics™, Bremen, Alemania) y después del secado se adicionó 1 microlitro de ácido fórmico al 70% y se dejó secar nuevamente a temperatura ambiente. Por último, se le agregó 1 microlitro de la matriz ácida de alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich™, Toluca, México). Posteriormente, la placa se introdujo en el equipo y se analizó con el software MALDI Biotyper 3.1 para la obtención del perfil espectral y se realizó el emparejamiento con la base de datos.

### **Soluciones “sello” de tratamiento antimicrobiano**

La finalidad del estudio fue analizar el efecto antimicrobiano de las soluciones sello con gentamicina. Para esto, se prepararon 2 soluciones de este antibiótico, una mezclada con heparina y la otra con citrato de sodio, que funcionan como anticoagulantes para su uso en el lumen del catéter de hemodiálisis. En ambas soluciones sello se usó una concentración definida de antibiótico de 8,192 microgramos/ mililitro ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), actualmente y de manera empírica se utiliza una concentración de 4,096  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el hospital y es aplicada en los pacientes.

Para preparar la solución sello de gentamicina/heparina, se disolvieron 81.92 miligramos (mg) de gentamicina en 10 mililitros (mL) de una solución de heparina (1000 UI) disuelta en agua inyectable. La concentración final de la gentamicina en esta solución fue de 8 mg/mL (8,192  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Por otra parte, también se preparó una solución sello de gentamicina/citrato de sodio, para esto, se disolvió 0.22 gramos (g) de citrato de

sodio dihidratado, 0.073 g de ácido cítrico anhidro y 0.245 g de glucosa monohidratada en 10 mL de agua inyectable. Una vez que se realizó esta solución, se agregaron 81.92 mg de gentamicina y se agitó por vórtex hasta formar una disolución translúcida.

En cuanto a la solución sello de gentamicina sin anticoagulante, se disolvieron 15.36 mg de gentamicina en 15 mL de agua estéril para biología molecular Corning™, obteniéndose una concentración total de 1,024 µg/mL.

### **Ensayo de formación de la biopelícula**

La capacidad de las bacterias de formar biopelícula fue evaluada mediante el ensayo semicuantitativo de cristal violeta. Los aislamientos clínicos se disolvieron en solución salina con un ajuste de concentración al 1.0 en escala de McFarland y se diluyeron 1:100 en TSB. Posteriormente, 200 µL de cada suspensión fueron transferidos en 4 pocillos de una placa de 96 pozos de poliestireno (4 repeticiones por aislamiento). Además, se incluyó *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (cepa control productora de biopelícula) y *Escherichia coli* ATCC 25911 (cepa control no productora de biopelícula). Después de 24 horas de incubación a 35°C, se transfirió por cada cepa 100 µL de sobrenadante (que corresponden a las células planctónicas) a pocillos nuevos y después se midió la densidad óptica de cada pocillo de células planctónicas a 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, MA, EE. UU.). Posteriormente fueron descartados los sobrenadantes y se dejó secar los pozos a aire ambiente y la biopelícula se fijó con 100 µL de metanol por 10

minutos, nuevamente se dejó secar a aire ambiente y se realizaron lavados con buffer de fosfatos salinos (PBS) con pH de 7. Después de eso, las biopelículas fueron teñidas con 100  $\mu$ L de cristal violeta al 0.5% durante 5 minutos. Por último, después de lavar el cristal violeta no captado, se disolvió esta biopelícula con 150  $\mu$ L de ácido acético glacial al 33% y se agitó a 100 revoluciones por minuto (rpm) en una incubadora oscilatoria a 25°C durante 15 minutos y se midió la densidad óptica de cada pozo a 595 nm en el espectrofotómetro.

La clasificación de la producción de biopelícula se realizó mediante los criterios de Stepanovic *et al.* (25) como se muestra en la tabla 1. Se midió la densidad óptica de corte (DO corte) que es igual a la DO del control negativo más tres veces la desviación estándar de la DO del control negativo.

**Tabla 1.** Criterios de Stepanovic para clasificación de producción de biopelícula.

<b>Valor de DO cepa</b>	<b>Producción de biopelícula</b>
DO cepa $\leq$ DO corte	No productora
DO corte < DO cepa $\leq$ 2 x DO corte	Producción débil
2 x DO corte < DO cepa $\leq$ 4 x DO corte	Producción moderada
DO cepa > 4 x DO corte	Producción fuerte

### **CMI de Células plantónicas**

Los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos se realizaron utilizando el método de microdilución en caldo usando caldo Mueller-Hinton (MH) siguiendo

las especificaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (26). En este estudio el único antimicrobiano que se utilizó fue la gentamicina y para esto, se creó una solución stock de 1,024 µg/ml para realizar las distintas diluciones. El inóculo bacteriano que se usó para este ensayo fue correspondiente al 0.5 en la escala de McFarland, y se prepararon alícuotas de 1:150 que se transfirieron a la placa de 96 pozos de poliestireno donde se le agregó 100 µL de gentamicina y soluciones sello en diluciones seriadas. La concentración más elevada de la solución sello de gentamicina fue de 128 µg/ml, de gentamicina - heparina 2,048 µg/ml - 1,000 UI/mL y gentamicina - citrato 2,048 µg - 33%. Las placas se incubaron en condiciones aerobias durante 16 a 20 horas a 35°C. Todos los aislamientos se realizaron por triplicado para determinar la concentración a la cual se inhibe el crecimiento de la cepa (caldo translúcido).

### **Concentración mínima inhibitoria de biopelícula**

Se analizó la eficacia que tienen la gentamicina y las soluciones sello para evitar la formación de biopelícula. La cuantificación y clasificación de la formación de la biopelícula se realizó mediante la técnica de cristal violeta como se ha mencionado anteriormente. Para medir la CMIB que necesitan las células bacterianas, se utilizó también suspensiones de las cepas a la concentración del estándar de McFarland al 1.0 diluidas 1:100 con caldo MH. Después, 100 µL de inóculo se transfirieron a las placas de 96 pozos, al igual que 100 µL de gentamicina y las soluciones sello en diluciones seriadas para su incubación por 24 horas a 35°C. La concentración más elevada de la solución sello de gentamicina fue de 512 µg/ml, de gentamicina-heparina 2,048 µg/ml - 1,000

UI/mL y gentamicina-citrato 2,048 µg/mL - 33%. Posteriormente, las células planctónicas se descartaron y los pocillos se lavaron con PBS estéril, se fijó la biopelícula con metanol y luego se tiñó con cristal violeta al 0.5% por 5 minutos. Por último, después de lavar el cristal violeta no captado, se disolvió esta biopelícula con 150 µL de ácido acético glacial al 33% por 15 minutos y después se determinó la concentración a la cual no hubo crecimiento de la cepa (caldo translúcido). Este ensayo se realizó por triplicado.

### **Concentración mínima erradicadora de biopelícula**

En dispositivo Calgary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá) de fondo plano se incubaron suspensiones bacterianas de un estándar al 0.5 McFarland diluida 1:100 en TSB. Se transfirieron 150 µL a los pocillos, quedando las clavijas de la tapa de dispositivo Calgary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá) inmersas en el medio y se incubó a 35°C por 24 horas. Luego, en una nueva placa de 96 pozos de poliestireno de fondo plano se prepararon diluciones seriadas de gentamicina y las soluciones sello con TSB. La concentración más elevada de la solución sello de gentamicina fue de 512 µg/mL, de gentamicina/heparina 4,096 µg/mL - 1,000 UI/mL y gentamicina-citrato 4,096 µg/mL - 33%. Se lavaron las clavijas por inmersión con PBS con pH de 7 para eliminar las células no adheridas y se trasladó la tapa de dispositivo Calgary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá) a la placa de 96 pozos de poliestireno con soluciones sello y se incubó por 24 horas a 35°C. Nuevamente se realizaron lavados de las clavijas y se colocaron en nueva placa de 96 pozos de fondo curvo con TSB, se dejó reposar 30 minutos y se sometió a sonicación por 5 minutos para liberar las bacterias y biomasa

adheridas a las clavijas. Posteriormente se descartó la tapa de dispositivo Calgary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá). Las placas se incubaron en condiciones aerobias durante 24 horas a 35°C. Todos los aislamientos se realizaron por triplicado para determinar la concentración a la cual se erradicó la biopelícula de la cepa (caldo translúcido).

### **Modelo de inhibición de crecimiento en catéter de hemodiálisis**

Para el desarrollo de este modelo se utilizaron sets de 4 catéteres por cada cepa que se analizó (1 para el desarrollo de biopelícula y 3 para evaluar tratamientos). Primero, se realizaron inóculos de las cepas bacterianas resuspendidas en TSB. Estas suspensiones se prepararon al 0.5 del estándar de McFarland y posteriormente se realizaron diluciones para inyectar el equivalente a aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL en los lúmenes de los catéteres MAHURKAR™ 13.5 Fr/Ch (4.5mm) x 19.5 cm lumen dual, catéter de diálisis agudo (1.3ml). Los lúmenes de los catéteres se pinzaron para incubarse por 24 horas a 35°C en movimiento de 100 rpm, para observar el desarrollo de biopelícula.

Posteriormente, el contenido de los catéteres se vació de forma aséptica y el catéter usado para observar el desarrollo de la biopelícula fue procesado para recuperar los microorganismos, mientras que los otros 3 catéteres se incubaron con las soluciones sello a las concentraciones a las cuales se demostró efecto de erradicación de biopelícula. Estos catéteres se incubaron durante 72



horas a 35°C (tiempo de residencia normal de las soluciones selladas en pacientes de HD).

Los microorganismos recuperados se cuantificaron de los catéteres después de los puntos de objetivo primario (24 horas en desarrollo de biopelícula y 72 horas en tratamientos). Para esto se abrieron las pinzas y el contenido de los catéteres fue descartado. Con el lumen abierto, con una jeringa estéril se inyectó 1 mL de solución salina fisiológica y se recolectó en un tubo estéril para su análisis. Para incrementar la recuperación de microorganismos, el tubo del enjuague se sonicó a 60 Hz por 1 minuto y se mezcló en vórtex durante 15 segundos. Por otra parte, se cortaron 3 segmentos de 3 cm de la línea proximal del catéter (la más cercana al cuerpo del paciente), se introdujeron en un tubo con 3 mL de solución salina, se sonicaron durante 1 minuto y se mezclaron por vórtex por 15 segundos. Por último, se prepararon diluciones seriadas para realizar cultivos en placas de agar soya tripticasa para la determinación de la cuenta bacteriana (UFC/mL).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS 20.0. Para la descripción de las variables CMI, CMIB y CMEB se utilizó frecuencia y porcentaje. Para la variable cuantitativa de UFC/mL se utilizaron medias y desviación estándar.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El protocolo de investigación fue sometido al Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González para su correspondiente autorización y aprobación. Clave de registro: IF23-00005.

## VARIABLES

- **Concentración mínima inhibitoria:** concentración más baja de antimicrobiano que previene el crecimiento de patógenos. (27)
- **Biopelícula:** matriz de sustancia polimérica extracelular con colonias de microorganismos, que funciona como una especie de hábitat controlado. (13)
- **Reducción de viabilidad celular:** efecto de reducción de población antimicrobiana expresada en menor recuento de UFC bacterianas. (28)

**Tabla 2.** Variables y definición operacional

Variable	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala
Concentración mínima inhibitoria	Mínima concentración utilizada de antibiótico que inhibe el crecimiento de la cepa en estudio.	1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1: 128, 1: 256.	Caldo traslúcido	Cuantitativa continua
Biopelícula	Matriz formada en los pozos, identificada por cristal violeta y analizada según la densidad óptica de cada pozo a 595 nm en un espectrofotómetro.	-Fuerte -Moderada -Débil	Resultado de DO por el espectrofotómetro de la cepa estudiada comparado con DO de la cepa no productora de biopelícula.  -Fuerte: DO cepa > 4 x DO corte. -Moderada: 2 x DO corte < DO cepa ≤ 4 x DO corte. -Débil: DO corte < DO cepa ≤ 2 x DO corte.	Cualitativa ordinal

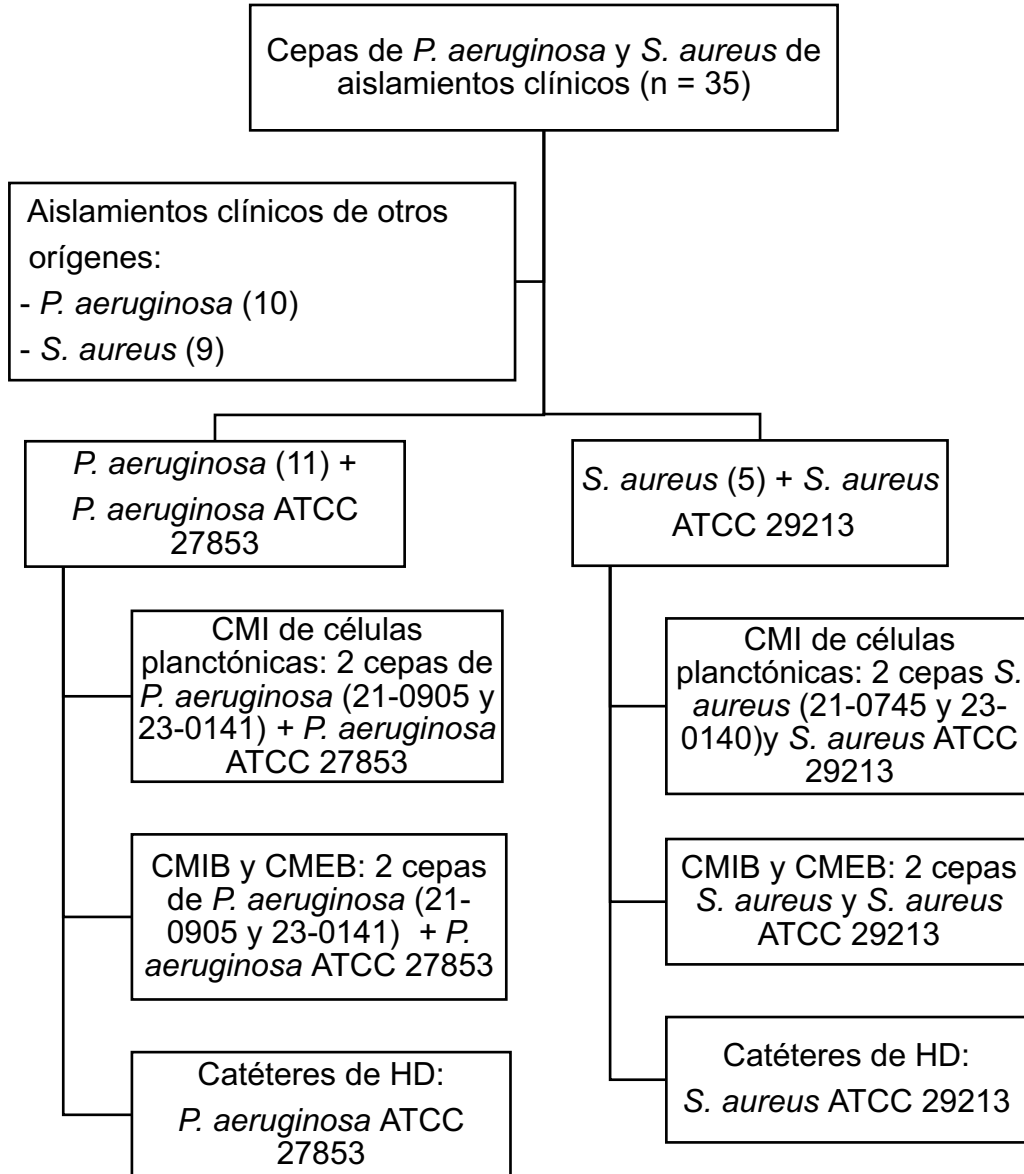
Reducción de viabilidad celular	Reducción en la formación de biopelícula según las unidades formadoras de colonias.	UFC/mL	Número de unidades formadoras de colonias.	Cuantitativa discreta
---------------------------------	---	--------	--	-----------------------

## RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 35 cepas que cumplían con todos los criterios en el análisis general, de las cuales 21 fueron de *P. aeruginosa* y 14 de *S. aureus*. De éstas 35, se excluyeron 10 cepas de *P. aeruginosa* y 9 cepas de *S. aureus* por ser aislamientos clínicos de otros orígenes. Posteriormente, se eligieron 2 cepas al azar de *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* cepa 21-0905 y 23-0141), además de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y 2 cepas *S. aureus* (*S. aureus* cepa 21-0745 y 23-0140) más *S. aureus* ATCC 29213 para determinar la CMI de células planctónicas, CMIB y CMEB. En este estudio, solamente las cepas ATCC fueron utilizadas para evaluar el efecto antimicrobiano de las soluciones sello en un modelo de crecimiento de biopelícula en catéteres de hemodiálisis no tunelizados (gráfico 1).

Se categorizaron las cepas de aislamientos de IAC según la producción de biopelícula acorde a los criterios de Stepanovic y las 16 (100%) cepas fueron productoras de biopelícula. De las cepas de *P. aeruginosa*, 9 (81.98%) presentaron producción fuerte y 2 (18.2%) tuvieron producción moderada. En el caso de *S. aureus*, hubo mayor variabilidad, 1 cepa (20%) fue productora fuerte, 2 cepas (40%) tuvieron producción moderada y 2 cepas (40%) producción débil (tabla 3).

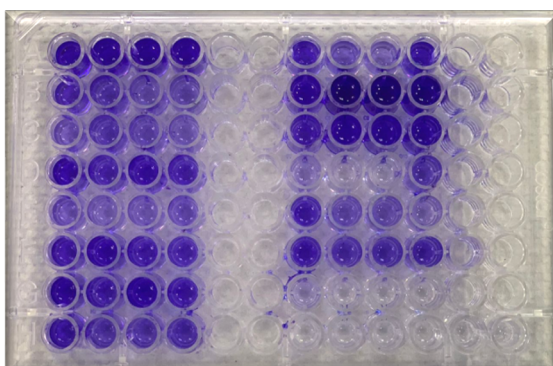
**Gráfico 1.** Distribución y elección de cepas.



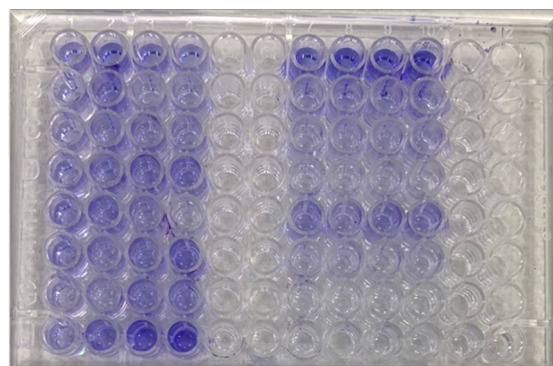
**Tabla 3.** Categorización de la formación de biopelícula de cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Cepas	Producción de biopelícula			No producción de biopelícula
	Fuerte (%)	Moderada (%)	Débil (%)	
<i>P. aeruginosa</i> (n=11)	9 (81.8)	2 (18.2)	-	-
<i>S. aureus</i> (n=5)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	-

**Imagen 1.** Formación de biopelícula de las cepas de *P. aeruginosa*.

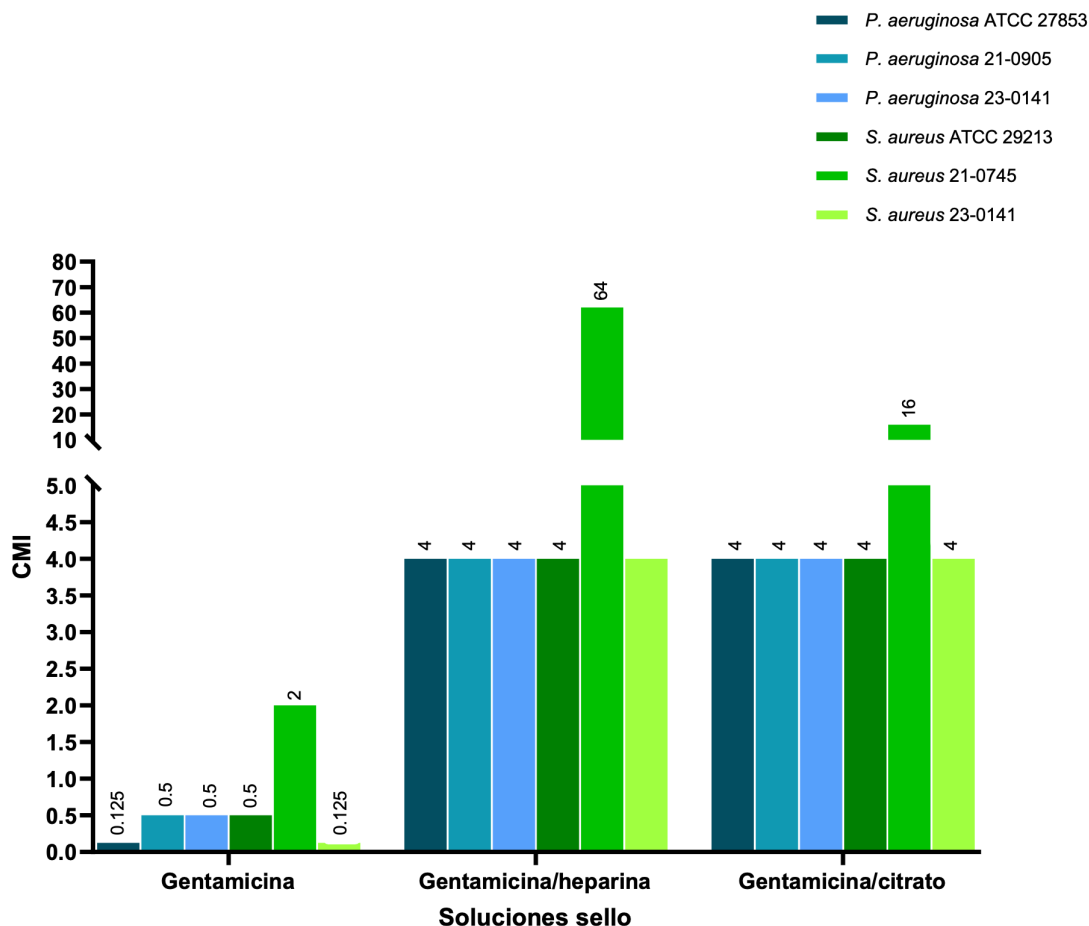


**Imagen 2.** Formación de biopelícula de las cepas de *S. aureus*.



La CMI de las células planctónicas de las cepas de *S. aureus* en el caso de gentamicina fue  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  y de *P. aeruginosa*  $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ . En el caso de la solución sello de gentamicina-heparina la CMI de las 3 cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 23-0140 fue  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  de gentamicina diluido en 2 UI/mL de heparina, en el caso de *S. aureus* 21-0745 fue  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  - 32 UI/mL. La CMI de gentamicina-citrato de las 3 cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 23-0140 fue  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  de gentamicina diluido en 0.06% de citrato y para *S. aureus* 21-0745 fue  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  - 0.02% (gráfico 2).

**Gráfico 2.** CMI *in vitro* de las células planctónicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* tratadas con soluciones sello de gentamicina, gentamicina/heparina y gentamicina/citrato.



En cuanto a la CMIB obtenida para gentamicina fue  $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$  en *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 21-0905, *P. aeruginosa* 23-0141, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 23-0141, para la cepa *S. aureus* 21-0745 fue  $\geq 16\mu\text{g/mL}$ . En el caso de gentamicina-heparina, la CMIB de *P.aeruginosa* 23-0141, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 23-0140 fue  $\geq 8\mu\text{g/mL}$  - 4 UI/mL, en *P. aeruginosa* 21-0905 fue  $\geq 16\mu\text{g/mL}$  - 8 UI/mL, *P. aeruginosa* ATCC 27853  $\geq 32\mu\text{g/mL}$  - 16 UI/mL y en *S. aureus* 21-0745 fue  $>2,048\mu\text{g/mL}$  - 1000 UI/mL. Los



resultados con gentamicina-citrato en general fueron menores, en las 3 cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* 23-0140 la CMIB obtenida fue  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  - 0.06%, para *S. aureus* ATCC 29213 fue  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  - 0.2% y en *S. aureus* 21-0745  $\geq 1,024 \mu\text{g/mL}$  - 16%. Durante los ensayos se evidenció que a mayor concentración de gentamicina/heparina la solución sello presentaba precipitación causando falsos positivos o falsa formación de biopelícula.

La CMEB de gentamicina para *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* 23-0141 fue  $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ , en el caso de *P. aeruginosa* 21-0905 fue  $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ . Difiriendo de la solución sello de gentamicina/heparina, en las cepas *P. aeruginosa* 21-0905 y 23-0141 fue  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  - 16 UI/mL y en *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue  $\geq 512 \mu\text{g/mL}$  - 125 UI/mL. En cuanto a la solución sello de gentamicina-citrato la CMEB de *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue  $\geq 128 \mu\text{g/mL}$  - 1% , *P. aeruginosa* 23-0141  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  - 2% y en *P. aeruginosa* 21-0905 fue  $\geq 1,024 \mu\text{g/mL}$  - 8%.

Respecto a las cepas de *S. aureus*, la CMEB de gentamicina para *S. aureus* 23-0140 fue  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , para *S. aureus* 21-745 fue  $> 512 \mu\text{g/mL}$  y *S. aureus* ATCC 29213 fue  $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ . En cuanto a gentamicina-heparina la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 23-0140 fue  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  - 62 UI/mL y la cepa *S. aureus* 21-0745 fue  $> 4,096 \mu\text{g/mL}$  - 1000 UI/mL. Para gentamicina-citrato se requirieron concentraciones más elevadas, las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 23-0140 fue  $\geq 2,048 \mu\text{g/mL}$  - 16% y *S. aureus* 21-745 fue  $> 4,096 \mu\text{g/mL}$  - 33% (grafico 3).

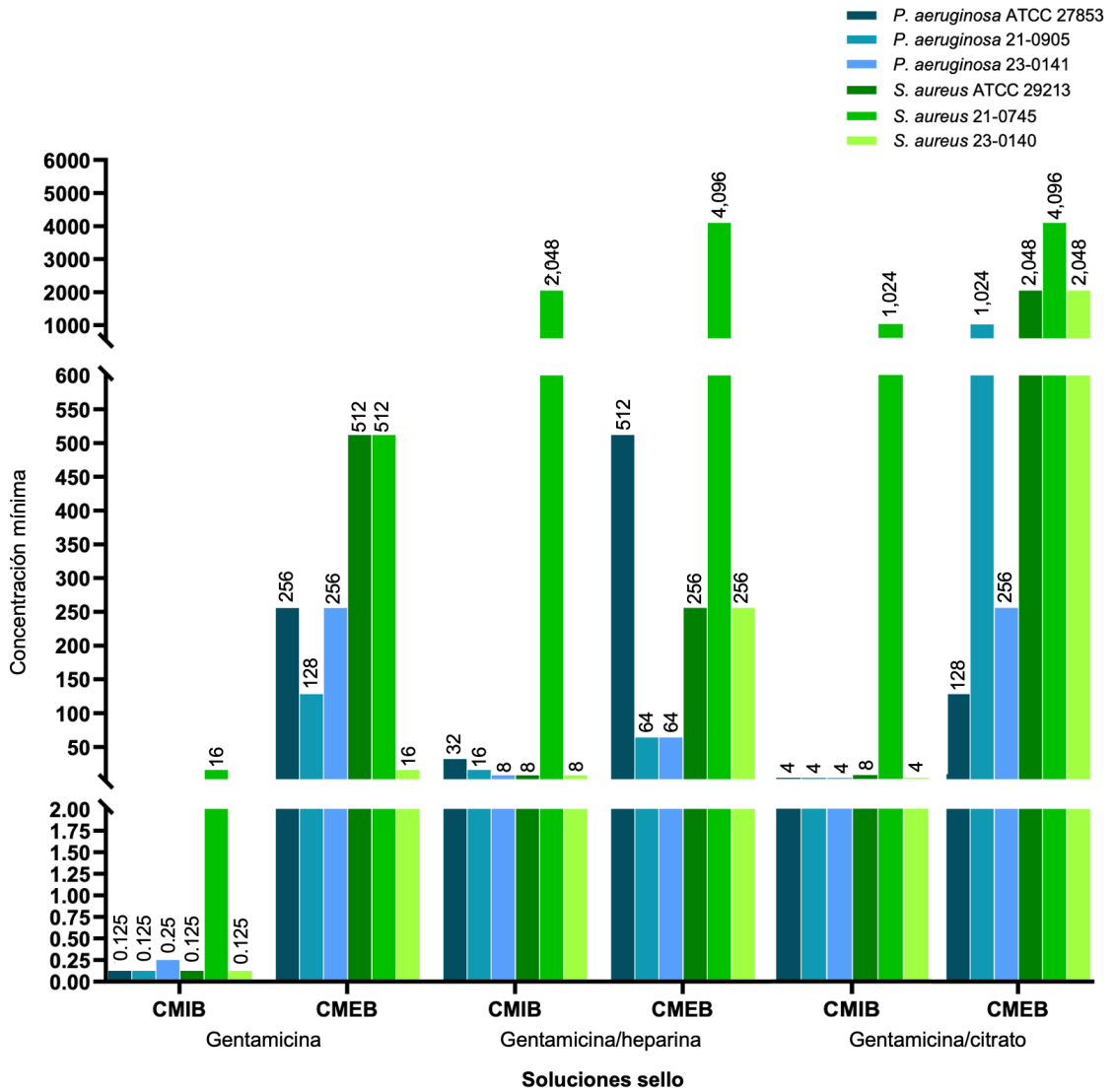
**Tabla 4.** CMI, CMIB y CMEB de gentamicina/heparina, gentamicina/citrato y gentamicina en aislamientos de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Cepas	Soluciones sello								
	Gentamicina $\mu\text{g/mL}$			Gentamicina $\mu\text{g/mL}$ - heparina UI/mL			Gentamicina $\mu\text{g/mL}$ - citrato %		
	CMI	CMIB	CMEB	CMI	CMIB	CMEB	CMI	CMIB	CMEB
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$\leq 0.125$	$\leq 0.125$	$\geq 256$	$\leq 4-2$	$\geq 32-16$	$\geq 512-125$	$\leq 4 - 0.06$	$\leq 4 - 0.06$	$\geq 128 - 1$
<i>P. aeruginosa</i> 21-0905	$\geq 0.5$	$\leq 0.125$	$\geq 128$	$\leq 4-2$	$\geq 16-8$	$\geq 64-16$	$\leq 4 - 0.06$	$\leq 4 - 0.06$	$\geq 1,024 - 8$
<i>P. aeruginosa</i> 23-0141	$\geq 0.5$	$\geq 0.25$	$\geq 256$	$\leq 4-2$	$\geq 8-4$	$\geq 64 - 16$	$\leq 4 - 0.06$	$\leq 4 - 0.06$	$\geq 256 - 2$
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	$\geq 0.5$	$\leq 0.125$	$\geq 512$	$\leq 4-2$	$\geq 8-4$	$\geq 256 - 62$	$\leq 4 - 0.06$	$\geq 8 - 0.1$	$\geq 2,048 - 16$
<i>S. aureus</i> 21-0745	$\geq 2$	$\geq 16$	$>512$	$\geq 64$	$> 2,048-1,000$	$> 4,096 - 1,000$	$\geq 16 - 0.2$	$\geq 1,024 - 16$	$>4,096 - 33$
<i>S. aureus</i> 23-0140	$\leq 0.125$	$\leq 0.125$	$\geq 16$	$2\leq 4-2$	$\geq 8-4$	$\geq 256 - 62$	$\leq 4 - 0.06$	$\leq 4 - 0.06$	$\geq 2,048 - 16$

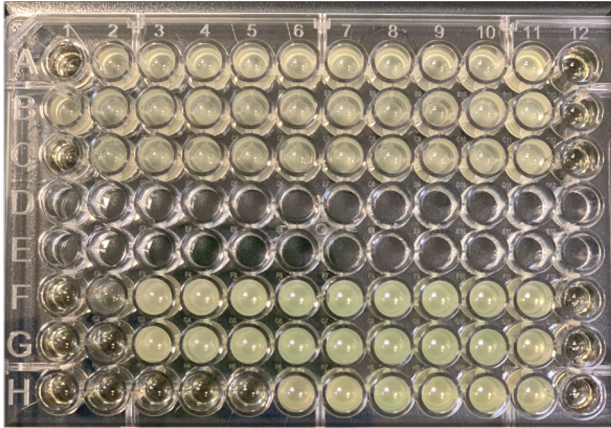
En el último objetivo enfocado en identificar el efecto antimicrobiano de las soluciones sello en un modelo de crecimiento de biopelícula en catéteres de HD no tunelizados solo se realizó el ensayo con *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Se usó como concentración para cada solución sello aquella que erradicó la formación de biopelícula (gentamicina 512 µg/mL, gentamicina 1,024 µg/mL diluido en 250 UI/mL de heparina, gentamicina 2,048 µg/mL diluido en citrato al 16%).

En la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 no se observó formación de biopelícula antes ni después de la colocación de las soluciones sello. Con respecto a la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 posterior a las 24 horas de incubación en el catéter se obtuvo por enjuague (flush)  $7.787 \log^{10}$  UFC/mL y por sonicación del catéter  $5.636 \log^{10}$  UFC/mL. Luego de colocar las diferentes soluciones sello e incubar por 72 horas gentamicina, gentamicina/heparina y gentamicina/citrato no se observó crecimiento en TSA por enjuague ni por sonicación de los catéteres en ninguna de las diluciones realizadas (gráfico 4).

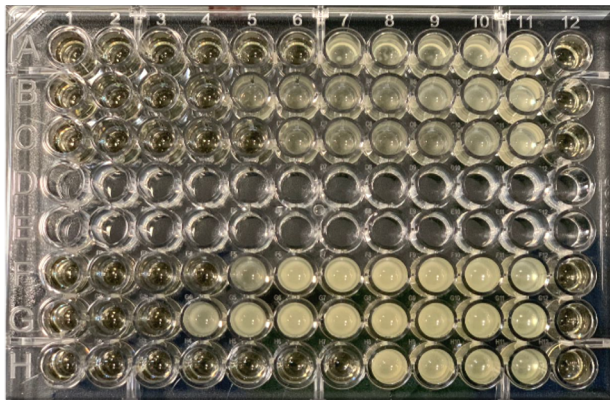
**Gráfico 3.** CMIB vs CMEB de *P. aeruginosa* y *S. aureus* tratadas con soluciones sello de gentamicina, gentamicina/heparina y gentamicina/citrato.



**Imagen 3.** Erradicación de biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213 (filas A, B y C) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (filas F, G y H) con diluciones seriadas de gentamicina.



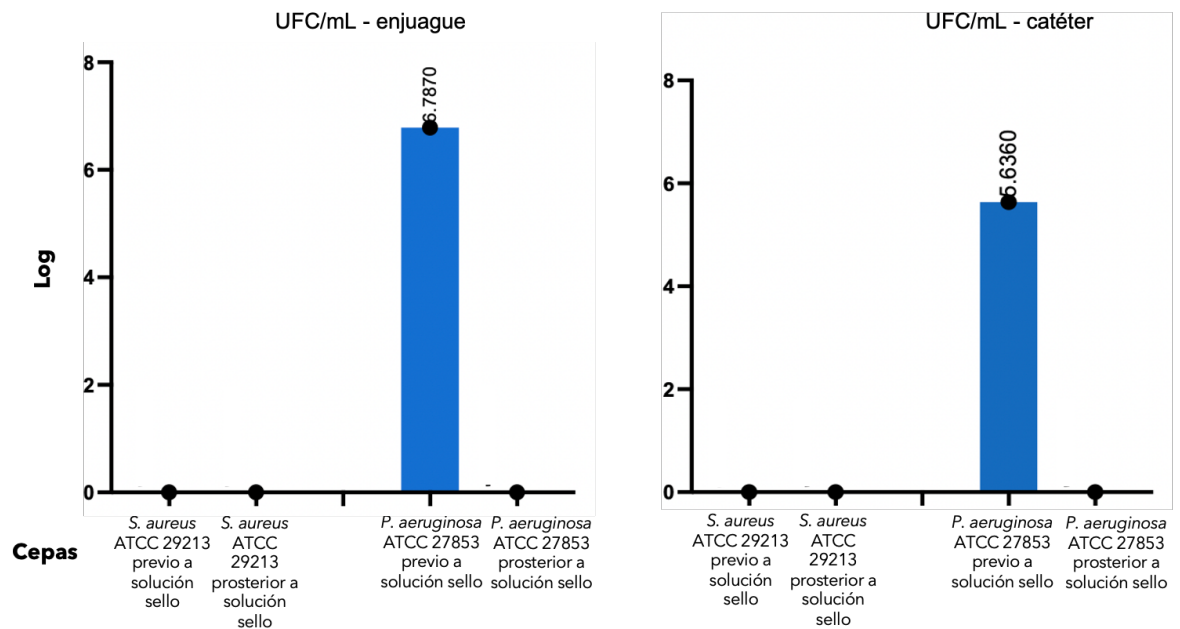
**Imagen 4.** Erradicación de biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213 (filas A, B y C) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (filas F, G y H) con diluciones seriadas de gentamicina/heparina.



**Imagen 5.** Erradicación de biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213 (filas A, B y C) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (filas F, G y H) con diluciones seriadas de gentamicina/citrato.



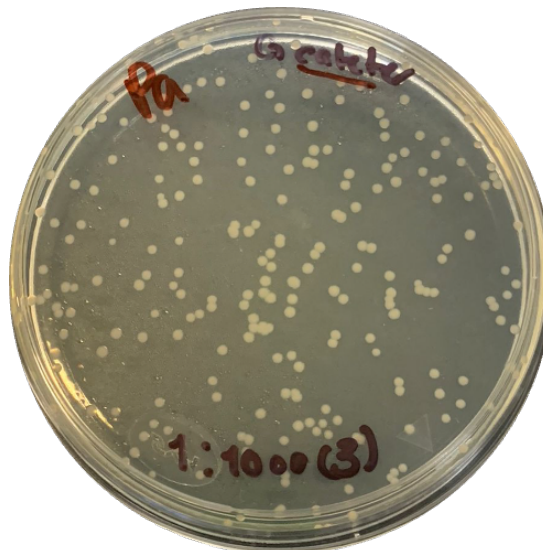
**Gráfico 4.** Efecto antimicrobiano de las soluciones sello en un modelo de crecimiento de biopelícula en catéteres de HD no tunelizados.



**Imagen 6.** Colonias de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en TSA posterior a incubación en catéter de HD por 24 horas a 35°C, dilución 1:10 de catéter de HD sonificado.



**Imagen 7.** Colonias de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en TSA posterior a incubación en catéter de HD por 24 horas a 35°C, dilución 1:1,000 de catéter de HD sonificado.



**Imagen 8.** Cultivo de catéter de HD sonificado sin crecimiento en TSA posterior a incubación de solución sello gentamicina/citrato 2,000 µg/mL en catéter de HD, dilución 1:1,000.





## DISCUSIÓN

En este estudio, las cepas analizadas de *S. aureus* y de *P. aeruginosa* fueron productoras de biopelícula, siendo *P. aeruginosa* productora fuerte en mayor proporción, similar a lo reportado previamente. (27) Todas las cepas de *S. aureus* fueron susceptibles a gentamicina (CMI  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ), sin embargo, requirieron concentraciones más elevadas para CMI, CMIB y CMEB en comparación con las cepas de *P. aeruginosa*. Esta diferencia puede estar relacionada con la resistencia a meticilina y a un efecto dependiente de concentración. (28, 29) De manera similar a reportes previos (30), en este estudio no se observó una correlación entre el tipo de producción de biopelícula y la CMI de células planctónicas, CMIB ni CMEB.

Las CMIB de gentamicina-heparina fueron mayores en comparación con gentamicina-citrato, principalmente en la cepa *S. aureus* 21-0745 que requirió concentraciones más elevadas de gentamicina-heparina ( $>2,048$   $\mu\text{g/mL}$  - 1000 UI/mL) vs gentamicina-citrato ( $\geq 1,024$   $\mu\text{g/mL}$  - 16%). La heparina puede actuar como inductor de formación de biopelícula en el caso específico de *S. aureus* y esto pudiera interferir con los resultados. Por lo que se deberían de estudiar mayor cantidad de cepas para atribuir este comportamiento al uso de heparina en las soluciones sello. (31,32)

Así mismo, durante los ensayos de inhibición, se observó precipitación de la solución sello de gentamicina-heparina causando interferencia, provocando un

efecto de falsa producción de biopelícula a mayor concentración de gentamicina y heparina. Estudios previos también han reportado esta interacción contraproducente entre dichos compuestos y sus problemas de solubilidad a altas concentraciones. (33, 34)

Las CMEB de gentamicina-citrato fueron más elevadas en comparación con gentamicina-heparina y gentamicina, diferente a lo observado con la CMIB donde fueron menores. Si bien la gentamicina es de los antibióticos más estudiados en soluciones sello por su efecto antimicrobiano combinado con heparina, con citrato e incluso con otros antibióticos como vancomicina, y a pesar de ser de los más usados como profilaxis, actualmente en la literatura, no hay estudios que comparen la eficacia en la erradicación o inhibición de biopelícula de soluciones sello de gentamicina-heparina contra gentamicina-citrato ni las diferentes combinaciones de concentraciones de heparina o citrato en conjunto con gentamicina. (20)

En general, todas las soluciones sello (gentamicina 512 µg/mL, gentamicina 1,024 µg/mL diluido en 250 UI/mL de heparina y gentamicina 2,048 µg/mL diluido en 16% de citrato) tuvieron efecto antimicrobiano en el modelo de crecimiento de biopelícula en catéteres de HD no tunelizados a las 72 horas de encontrarse intraluminal con *P. aeruginosa* ATCC 27853. Previamente, se demostró *in vivo* la reducción de BACHD con el uso de solución sello de gentamicina 4 mg/mL diluido en 1000 UI/mL de heparina. (9) En nuestro estudio se observó que incluso concentraciones más bajas de gentamicina-heparina (1,024 µg/mL – 250 UI/mL) son efectivas de forma *in vitro*. Por otra parte, se

considera que *S. aureus* ATCC 29213 no produjo formación de biopelícula en el catéter debido a que se incubó con movimiento y sin adicionar glucosa al TSB. (35, 36)

Dentro de las limitaciones de este estudio se observó que a mayor concentración de gentamicina-heparina ocurrió precipitación de la solución sello resultando en falsos positivos interfiriendo con el resultado. No obstante, fueron resultados aislados y no se tomaron en cuenta. Con respecto al efecto antimicrobiano en el modelo de crecimiento de biopelícula de catéteres de HD solo se estudiaron las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213. Sería ideal realizar este análisis con cepas clínicas y un mayor número de cepas en todos los objetivos para poder realizar un estudio comparativo con análisis estadístico con las diferentes soluciones sello a base de gentamicina, demostrando su estabilidad y efectividad.

## CONCLUSIONES

Todas las soluciones sellas estudiadas lograron erradicar la biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC 27853 tras mantenerse intraluminal por 72 horas a 35 °C en un modelo de crecimiento de biopelícula en catéteres de HD no tunelizados. De igual forma, con las soluciones sellas se observó inhibición y erradicación de biopelícula a concentraciones menores a 4 mg/mL de gentamicina, planteándose la posibilidad de reducción de la concentración de estas soluciones para su uso en pacientes que portan un dispositivo de catéter de HD no tunelizado. Las CMEB fueron mayores en comparación con CMIB y CMI de células planctónicas en la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Nuestros resultados muestran correlación entre los resultados *in vivo* de disminución de la tasa de BACHD por *P. aeruginosa* y *S. aureus* y los hallazgos microbiológicos *in vitro* con las soluciones sellas, ya que todas las soluciones sellas tuvieron efecto antimicrobiano sobre la formación de biopelícula de las cepas estudiadas. Sin embargo, es importante analizar más cepas de *S. aureus* ante el comportamiento *in vitro* tan distinto entre una cepa y otra en este estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. What are healthcare-associated infections? (2018, enero 30). APIC. [https://apic.org/monthly\\_alerts/what-are-healthcare-associated-infections/](https://apic.org/monthly_alerts/what-are-healthcare-associated-infections/)
2. Types of healthcare-associated infections. (2019, abril 19). Cdc.gov. <https://www.cdc.gov/hai/infectiontypes.html>
3. O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, Lipsett PA, Masur H, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph AG, Rupp ME, Saint S; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis*. 2011 May;52(9):e162-93.
4. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections - an overview. *Infect Drug Resist*. 2018 Nov 15;11:2321-2333.
5. Chronic Kidney Disease in the United States, 2021. (2022, agosto 2). Cdc.gov. <https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/ckd-national-facts.html>
6. La Enfermedad Renal Crónica en México. (s/f). Insp.mx. Recuperado el 22 de octubre de 2022, de <https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html>
7. Méndez-Durán A, Méndez-Bueno JF, Tapia-Yáñez T, Muñoz Montes A, Aguilar-Sánchez L. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Dial Traspl*. 2010;31(1):7-11.

8. Pop-Vicas A, Strom J, Stanley K, D'Agata EM. Multidrug-resistant gram-negative bacteria among patients who require chronic hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 May;3(3):752-8.
9. Padilla-Orozco M, Mendoza-Flores L, Herrera-Alonso A, Garza González E, Gutiérrez Ferman JL, Rodríguez-López JM, Bocanegra-Ibarias P, Camacho-Ortiz A. Generalized and Prolonged Use of Gentamicin-Lock Therapy Reduces Hemodialysis Catheter-Related Infections Due to Gram Negatives. *Nephron*. 2019;143(2):86-91.
10. Almenara-Tejederas M, Rodríguez-Pérez MA, Moyano-Franco MJ, de Cueto-López M, Rodríguez-Baño J, Salgueira-Lazo M. Tunneled catheter-related bacteremia in hemodialysis patients: incidence, risk factors and outcomes. A 14-year observational study. *J Nephrol*. 2022 Aug 17.
11. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS*. 2017 Apr;125(4):365-375.
12. Farrington CA, Allon M. Complications of Hemodialysis Catheter Bloodstream Infections: Impact of Infecting Organism. *Am J Nephrol*. 2019;50(2):126-132.
13. Haque MM, Mosharaf MK, Haque MA, Tanvir MZH, Alam MK. Biofilm Formation, Production of Matrix Compounds and Biosorption of Copper, Nickel and Lead by Different Bacterial Strains. *Front Microbiol*. 2021 Jun 10;12:615113.
14. Dang F, Li H, Tian J, Wang R, Ren J. What is the best catheter lock solution in preventing catheter-related blood infections? A protocol for a Bayesian

- network meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2019 Jun 28;9(6):e030019.
15. Véliz, I. O., Arellano, C. M., Oquendo, E. L., & Álvarez, M. J. A. (2021). Tendencias actuales sobre las infecciones asociadas al uso de catéter venoso central. *Journal of American Health, Especial*.
  16. Villalon N, Farzan N, Freeman K. Rate of bacteremia in the hemodialysis patient presenting to the emergency department with fever: a retrospective chart review. *Int J Emerg Med*. 2018 May 25;11(1):29.
  17. Dadi NCT, Radochová B, Vargová J, Bujdánková H. Impact of Healthcare-Associated Infections Connected to Medical Devices-An Update. *Microorganisms*. 2021 Nov 11;9(11):2332.
  18. Yiqin Wang & Xuefeng Sun (2022) Reevaluation of lock solutions for Central venous catheters in hemodialysis: a narrative review, *Renal Failure*, 44:1, 1501-1518.
  19. Dang FP, Li HJ, Wang RJ, Wu Q, Chen H, Ren JJ, Tian JH. Comparative efficacy of various antimicrobial lock solutions for preventing catheter-related bloodstream infections: A network meta-analysis of 9099 patients from 52 randomized controlled trials. *Int J Infect Dis*. 2019 Oct;87:154-165.
  20. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist*. 2014 Dec 12;7:343-63.
  21. van den Bosch CH, van Woensel J, van de Wetering MD. Prophylactic antibiotics for preventing gram-positive infections associated with long-term central venous catheters in adults and children receiving treatment for cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Oct 7;10(10):CD003295.

22. Kerry L. LaPlante, Leonard A. Mermel, *In vitro* activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 22, Issue 8, August 2007, Pages 2239–2246.
23. Chauhan A, Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Full and broad-spectrum in vivo eradication of catheter-associated biofilms using gentamicin-EDTA antibiotic lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6310-8.
24. Hussein WF, Gomez N, Sun SJ, Yu J, Yang F, Ajuria M, Abra GE, Schiller B. Use of a gentamicin-citrate lock leads to lower catheter-related bloodstream infection rates and reduced cost of care in hemodialysis patients. *Hemodial Int*. 2021 Jan;25(1):20-28.
25. Singh AK, Prakash P, Achra A, Singh GP, Das A, Singh RK. Standardization and Classification of *In vitro* Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis*. 2017 Jul-Sep;9(3):93-101.
26. CLSI. [Performance standards for antimicrobial susceptibility testing]. [3<sup>rd</sup> Edition]. CLSI guideline [M100]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; [2021].
27. Yadav MK, Chae SW, Go YY, Im GJ, Song JJ. *In vitro* Multi-Species Biofilms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and Their Host Interaction during *In vivo* Colonization of an Otitis Media Rat Model. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Apr 18;7:125.
28. Pérez Norton, Pavas Norma, Rodríguez Emma Isabel. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos en un hospital de la orinoquia



- colombiana. Infect. [Internet]. 2010 Sep [cited 2023 Nov 03]; 14(3): 167-173.
29. Tam VH, Kabbara S, Vo G, Schilling AN, Coyle EA. Comparative pharmacodynamics of gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Aug;50(8):2626-31.
  30. Wannigama, D.L., Hurst, C., Hongsing, P. *et al*. Un método rápido y simple para la determinación rutinaria de la sensibilidad a los antibióticos a las poblaciones de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 19, 8 (2020).
  31. Shanks RM, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL, O'Toole GA. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):4596-606.
  32. Najarzadeh Z, Zaman M, Sereikaite V, Strømgaard K, Andreassen M, Otzen DE. Heparin promotes fibrillation of most phenol-soluble modulin virulence peptides from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2021 Aug;297(2):100953.
  33. McIntyre CW, Hulme LJ, Taal M, Fluck RJ. Locking of tunneled hemodialysis catheters with gentamicin and heparin. *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):801-5.
  34. Droste JC, Jeraj HA, MacDonald A, Farrington K. Stability and in vitro efficacy of antibiotic-heparin lock solutions potentially useful for treatment of central venous catheter-related sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Apr;51(4):849-55.

35. Nair S, Desai S, Poonacha N, Vipra A, Sharma U. Antibiofilm Activity and Synergistic Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilms by Bactericidal Protein P128 in Combination with Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Nov 21;60(12):7280-7289.
36. Seyyed Askhan Senobar  
Tahaei, Anette Stájer, Ibrahim Barrak, Eszter Ostorházi, Dóra Szabó & Mária Gajdács (2021) Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature, *Infection and Drug Resistance*, 14:, 1155-1168.