

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONALES
SOBRE LA INHIBICIÓN Y ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y
Stenotrophomonas maltophilia DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL DE
MÉXICO.

Por:

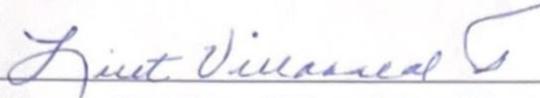
M.C. EDEER IVAN MONTOYA HINOJOSA

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

2025

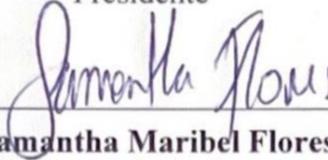
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONALES
SOBRE LA INHIBICIÓN Y ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y
Stenotrophomonas maltophilia DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL DE MÉXICO.

Comité de Tesis



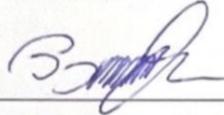
Dra. Licet Villareal Treviño

Presidente



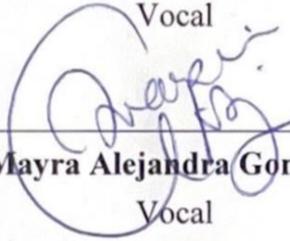
Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Secretario



Dra. Paola Bocanegra Ibarias

Vocal



Dra. Mayra Alejandra Gomez Govea

Vocal



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal

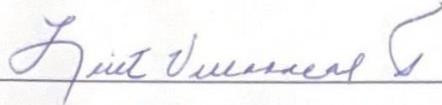


Dra. Katiushka Arevalo
Subdirección de posgrado



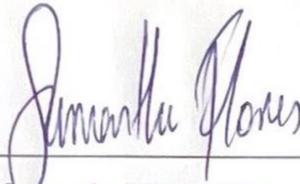
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONALES
SOBRE LA INHIBICIÓN Y ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y
Stenotrophomonas maltophilia DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL DE MÉXICO.

Dirección de tesis



Dra. Licet Villareal Treviño

Director



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) con clave A1-S-284041.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología a CONACYT, por el apoyo administrativo como económico y al Servicio de Infectología, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Por todo el apoyo brindado.

*A la **Dra. Licet Villarreal**, por abrirme las puertas y permitirme ser uno de sus alumnos de posgrado, confianza, apoyo y su gran bondad, así como paciencia brindada a cada estudiante.*

*A la **Dra. Samantha Flores**, por su apoyo y aportarme parte de sus conocimientos su paciencia, y enseñarme la dedicación por la ciencia.*

*A la **Dra. Paola Bocanegra Ibarias**, por cada detalle y momento para aclarar cualquier duda que me surgiera y compartirme parte sus conocimientos.*

*A **Samantha Villarreal, Edith Delgado, Mauricio del Rio, Xochitl Melendez, Rodrigo Pérez**, gracias por las experiencias y apoyo en el laboratorio y brindarme su amistad. A los químicos de servicio de infectología por los momentos divertidos y amenizar en momentos de estrés.*

*A mis Padres (**Dionisia Hinojosa y Vicente Montoya**) y hermana (**Edith Montoya**), que son el motor incondicional que me motiva a hacer cada cosa y cada uno de mis proyectos, sin dudarlo o pensarlo me apoyan en cada momento de la vida.*

*A **Pedro Avitia, Beatriz Sixto, Tania Heredia y Ada Leal**, por ser parte de cada una de las experiencias vividas en esta trayectoria, ser aquellos grandes amigos que siempre estuvieron en buenos y malos momentos para llegar juntos hasta el final de esta etapa.*

DEDICATORIA

*A mis padres y hermana que a pesar de la lejanía siempre están y estarán apoyándome
hasta el final.*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS _____	v
DEDICATORIA _____	vi
Resumen _____	xii
1. Introducción _____	xiii
2. Antecedentes _____	3
2.1 Generalidades _____	3
2.2 Clasificación y taxonomía _____	4
2.2.1 <i>Achromobacter</i> spp. _____	4
2.2.2 <i>Burkholderia</i> spp. _____	4
2.2.3 <i>Stenotrophomonas</i> spp. _____	5
2.3 Epidemiología y transmisión _____	5
2.4 Importancia clínica _____	7
2.5 Identificación y diagnóstico _____	8
2.6 Resistencia antimicrobiana _____	9
2.6.1 <i>Achromobacter</i> _____	10
2.6.1.1 Mecanismos de resistencia en <i>Achromobacter</i> _____	10
2.6.2 <i>Burkholderia</i> _____	11
2.6.2.1 Mecanismos de resistencia en <i>Burkholderia</i> _____	11
2.6.3 <i>Stenotrophomonas</i> _____	14
2.6.3.1 Mecanismos de resistencia en <i>Stenotrophomonas</i> _____	14
2.7 Factores de virulencia _____	16
2.7.1 Biopelícula _____	16
2.7.1.1 Biopelícula en <i>Achromobacter</i> _____	17
2.7.1.2 Biopelícula en <i>Burkholderia</i> _____	18
2.7.1.3 Biopelícula en <i>Stenotrophomonas</i> _____	19
3. Justificación _____	26
4. Hipótesis _____	27
5. Objetivos _____	28
5.1 Objetivo general _____	28
5.2 Objetivos particulares _____	28
6. Material y métodos _____	29
6.1 Sitio de estudio _____	29
6.2 Declaración ética _____	29
6.3 Selección de aislamientos clínicos e identificación de especies _____	29
6.3.1 Identificación a nivel especie por secuenciación _____	30
6.4 Determinación de la producción de biopelícula _____	30
6.4.1 Determinación de la composición de biopelícula _____	31
6.5 Determinación de la presencia de genes asociados a biopelícula _____	32
6.6 Determinación de la farmacorresistencia en células planctónicas _____	33
6.7 Determinación de la presencia de genes asociados a farmacorresistencia _____	33
6.8 Determinación de la farmacorresistencia en células de biopelícula _____	34
6.8.1 Actividad de los antibióticos en la inhibición de biopelícula _____	34
6.8.2 Actividad de los antibióticos en la erradicación de biopelícula _____	35
6.9 Análisis estadístico _____	35
7. Resultados _____	37
7.1 Aislamientos clínicos incluidos en el estudio _____	37

7.2	Producción de biopelícula de los aislamientos clínicos _____	37
7.3	Composición de biopelícula de los aislamientos clínicos _____	37
7.4	Presencia de genes asociados a la formación de la biopelícula _____	39
7.5	Farmacorresistencia de los aislamientos clínicos en células planctónicas _	39
7.6	Presencia de genes asociados a farmacorresistencia _____	40
7.7	Actividad de los antibióticos en la inhibición de biopelícula _____	41
7.7.1	<i>Achromobacter</i> spp. _____	41
7.7.2	<i>Burkholderia</i> spp. _____	41
7.7.3	<i>Stenotrophomonas</i> spp. _____	41
7.8	Actividad de los antibióticos en la erradicación de biopelícula _____	43
7.8.1	<i>Achromobacter</i> spp. _____	43
7.8.2	<i>Burkholderia</i> spp. _____	43
7.8.3	<i>Stenotrophomonas</i> spp. _____	44
8.	Discusión _____	47
9.	Conclusiones _____	53
10.	Referencias _____	55

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Secuencias de los primers y tamaño de los genes asociados a biopelícula.
- Tabla 2.** Secuencias de los primers y tamaño de los genes asociados a farmacorresistencia.
- Tabla 3.** Producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp.
- Tabla 4.** Genes asociados a la producción de biopelícula de *Stenotrophomonas* spp.
- Tabla 5.** Perfiles de farmacorresistencia de los aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia*.
- Tabla 6.** Genes asociados a resistencia a ceftazidima de *Stenotrophomonas* spp y *Burkholderia* spp.
- Tabla 7.** Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de inhibición de biopelícula de aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp.
- Tabla 8.** Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de inhibición de biopelícula de aislamientos clínicos de *Burkholderia* spp.
- Tabla 9.** Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de inhibición de biopelícula de aislamientos clínicos *Stenotrophomonas*.
- Tabla 10.** Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de biopelícula de aislamientos clínicos de *Achromobacter*, *Burkholderia* y *Stenotrophomonas*.

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Composición de la biopelícula de aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* *Burkholderia* spp. y *Achromobacter* spp.

Figura 2. Actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de especies de *Achromobacter*.

Figura 3. Actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de especies de *Burkholderia*.

Figura 4. Actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de *Stenotrophomonas maltophilia*.

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

- CBC** · Complejo Burkholderia cepacia
- CDC** · Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
- CLSI** · Instituto de estándares clínicos y de Laboratorio
- CMEB** · Concentración mínima de erradicación de biopelícula
- CMI** · Concentración mínima inhibitoria
- CMIB** · Concentración mínima de inhibición de biopelícula
- CST** · Caldo soya triptica
- DO** · Densidad óptica
- EPI** · Programa de Infecciones Emergentes
- EPS** · Exopolisacáridos
- EUCAST** · Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos
- FQ** · Fibrosis quística
- IAAS** · Infecciones asociadas a la atención de salud
- LPS** · Lipopolisacáridos
- 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
- MLST** · Tipificación de secuencias multilocus
- OMS** · Organización Mundial de la Salud
- PBS** · Buffer salino de fosfatos PIA
- SEM** · Microscopía electrónica de barrido
- TEM** · Microscopía electrónica de transmisión
- TMP-SXT** · Trimetoprim-sulfametoxazol
- UCI** · Unidad de cuidados intensivos

Resumen

Dentro de los bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa de relevancia clínica menos estudiados que están tomando más importancia clínica están *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp. Estos importantes patógenos oportunistas, son responsables de diversas infecciones asociadas a la atención de la salud o adquiridas en comunidad, con alta morbilidad y mortalidad. Poseen multifarmacorresistencia y factores de virulencia como la producción de biopelícula. El objetivo de este trabajo fue determinar la producción y composición de biopelícula en aislamientos clínicos de estos géneros y determinar el efecto de diferentes antibióticos convencionales en la inhibición y erradicación de biopelícula. Caracterizar la farmacorresistencia, los factores de virulencia y la epidemiología de las bacterias Gram negativas no fermentadoras de glucosa presentes en un hospital de tercer nivel en México. Se incluyeron aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp. (n=24), *Burkholderia* spp. (n=12), y *Stenotrophomonas* spp. (n=97), del año 2018 al 2021, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Se determinó la producción de biopelícula mediante la tinción con cristal violeta. Se determinó la concentración mínima inhibidora de la biopelícula (CMIB), concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB) y el perfil de resistencia a los antibióticos mediante la técnica de microdilución en caldo. De acuerdo con los resultados, más del 85% de los aislamientos clínicos se relacionó con infecciones a nivel respiratorio; el microorganismo más frecuentemente relacionado fue *S. maltophilia*. La producción de biopelícula fue mayor en las cepas de *S. maltophilia* (87.6%) comparado con la producción de biopelícula en *Burkholderia* (41.6%) y *Achromobacter* (8.3%). La resistencia en los aislamientos clínicos aumentó debido a la producción de biopelícula, en particular a ceftazidima y trimetoprim-sulfametoxazol para *Achromobacter*, *Burkholderia*, y *Stenotrophomonas*; cloranfenicol y levofloxacino en *Burkholderia*; y cloranfenicol en *S. maltophilia*. Los antibióticos que pudieron erradicar la biopelícula fueron levofloxacina en *S. maltophilia*, minociclina y meropenem en *Burkholderia*, y meropenem en *Achromobacter*.

Palabras clave: bacilos no fermentadores, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, resistencia, biopelícula, MALDI-TOF, erradicación.

Abstract

Among the less-studied clinically relevant non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli that are gaining clinical importance are *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp., and *Stenotrophomonas* spp. These important opportunistic pathogens are responsible for various healthcare-associated or community-acquired infections, with high morbidity and mortality. They exhibit multidrug resistance and virulence factors such as biofilm production. The aim of this study was to determine the production and composition of biofilm in clinical isolates of these genera and to assess the effect of different conventional antibiotics on biofilm inhibition and eradication. Additionally, it aimed to characterize antimicrobial resistance, virulence factors, and the epidemiology of non-glucose-fermenting Gram-negative bacteria present in a tertiary-level hospital in Mexico. Clinical isolates of *Achromobacter* spp. (n=24), *Burkholderia* spp. (n=12), and *Stenotrophomonas* spp. (n=97) were included from 2018 to 2021, obtained from the "Dr. José Eleuterio González" University Hospital of UANL. Biofilm production was determined using crystal violet staining. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC), minimum biofilm eradication concentration (MBEC), and antibiotic resistance profiles were determined using the broth microdilution technique. According to the results, more than 85% of clinical isolates were associated with respiratory infections, with *S. maltophilia* being the most frequently identified microorganism. Biofilm production was highest in *S. maltophilia* strains (87.6%), compared to *Burkholderia* (41.6%) and *Achromobacter* (8.3%). Resistance in clinical isolates increased due to biofilm production, particularly to ceftazidime and trimethoprim-sulfamethoxazole in *Achromobacter*, *Burkholderia*, and *Stenotrophomonas*; chloramphenicol and levofloxacin in *Burkholderia*; and chloramphenicol in *S. maltophilia*. The antibiotics that were able to eradicate biofilm were levofloxacin in *S. maltophilia*, minocycline and meropenem in *Burkholderia*, and meropenem in *Achromobacter*.

Keywords: Non-fermenting bacilli, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, resistance, biofilm, MALDI-TOF, eradication.

1. Introducción

Dentro de los bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa de relevancia clínica, los más importantes son los géneros de *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. Otros patógenos menos estudiados como *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp. están tomando más importancia clínica debido a que pueden presentar multifarmacorresistencia (MFR) y se complica su tratamiento. Estas bacterias son un creciente problema de salud a nivel mundial, con prevalencia de 6.7–7.7 % (El Chakhtoura et al., 2017; Sader & Jones, 2005).

Estos importantes patógenos oportunistas, son responsables de diversas infecciones asociadas a la atención de la salud o adquiridas en comunidad, con alta morbilidad y mortalidad. Poseen diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, que pueden ser intrínsecos o adquiridos. Además, poseen distintos factores de virulencia como la producción de biopelícula en superficies abióticas y bióticas, que permite y favorece la colonización e invasión en los pacientes infectado (Malone et al., 2017)s. Últimamente han presentado altas tasas de resistencia a los antibióticos, complicando la elección de tratamiento (Farinas y Martínez-Martínez 2013, Flores-Trevino *et al.*, 2019; Mannaa *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2019).

A través de la producción de biopelícula, estas células presentan una mayor resistencia a tratamientos convencionales, lo que plantea un desafío crítico para el tratamiento de infecciones crónicas (Kaplan, 2011). La formación de biopelícula regulada por la expresión de diversos genes no solo aumenta la virulencia de estos patógenos, también dificulta la erradicación efectiva de los microorganismos (Zhuo, Zhao, & Xiao, 2014).

El método común para determinar la efectividad antimicrobiana de un antibiótico se realiza por la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), el cual es útil en el tratamiento de infecciones agudas (Malone et al., 2017). Sin embargo, en infecciones crónicas o asociadas a dispositivos médicos, donde las biopelículas tienen un papel fundamental, las terapias basadas en CMI pueden no ser efectivas. Este método evalúa las células planctónicas, lo que no refleja adecuadamente las características

asociadas en células productoras de biopelícula y puede llevar a un tratamiento ineficaz (Kaplan, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es caracterizar la farmacorresistencia, los factores de virulencia y la epidemiología de las bacterias Gram negativas no fermentadoras de glucosa presentes en un hospital de tercer nivel en México.

2. Antecedentes

2.1 Generalidades

El desarrollo de infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS) y el uso inadecuado de antimicrobianos son importantes amenazas en pacientes hospitalizados y de la comunidad, con un aumento considerable en la morbilidad y la mortalidad. Durante los últimos años, dependencias como el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), la Organización Mundial de la Salud (OMS), además del Programa de Infecciones Emergentes (EIP, por sus siglas en inglés) desde 1995 crearon una red de vigilancia e investigación en salud pública basada en infecciones generadas por bacterias que han enfocado sus esfuerzos para la eliminación y prevención de IAAS. Sin embargo, es un desafío para la salud a nivel mundial, especialmente en países en desarrollo, ya que existe rápida propagación y aumento de bacterias patógenas causantes de IAAS, con características de farmacorresistencia a una amplia gama de antibióticos, lo que dificulta o imposibilita el tratamiento de estas infecciones con antibióticos disponibles.

Estas bacterias Gram negativas, no fermentadoras de glucosa son un grupo heterogéneo de Proteobacterias, que se caracterizan por la incapacidad de fermentar azúcares para generar energía para su función celular. Incluyen especies de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, el complejo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, además de algunos géneros menos frecuentemente aislados, como *Achromobacter* spp. *Pseudomonas* tiene frecuencias del 59%, *S. maltophilia* del 18.9%, *Burkholderia cenocepacia* del 13.8% y *A. xylosoxidans* del 6.9% (Abbott y Peleg 2015). Estos microorganismos son ubicuos, especialmente en ambientes acuáticos y en superficies abióticas (Chawla *et al.*, 2013; Leber 2020). En humanos, se aíslan con mayor frecuencia de muestras del tracto respiratorio e infecciones invasivas como bacteriemia y sepsis. Así mismo, son de mayor prevalencia en infecciones oportunistas que afectan a pacientes de inmunodeprimidos (Samonis *et al.*, 2012; Tohamy *et al.*, 2018). En los últimos años, estas bacterias han demostrado una resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos, lo que reduce las terapias disponibles y recursos para combatir su aumento. Por lo tanto, es de gran importancia crear prácticas y políticas efectivas de prevención frente a estas infecciones, además de realizar estudios de epidemiología sobre

los patógenos que comúnmente son resistentes a antimicrobianos causantes de infecciones nosocomiales (Koch *et al.*, 2015).

2.2 Clasificación y taxonomía

2.2.1 *Achromobacter* spp.

En la actualidad, el género *Achromobacter* spp. forma parte del orden Burkholderiales, dentro de la familia *Alcaligenaceae*, y consta de al menos 30 especies, entre las que se destacan *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter marplatensis*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter spanius* y *Achromobacter xylosoxidans* (P. Vandamme *et al.*, 2013; P. A. Vandamme *et al.*, 2016). Este género de bacterias son bacilos Gram negativos, móviles, aerobios, no fermentadores de glucosa; catalasa y oxidasa positivos. Están distribuidos en el medio ambiente y han emergido como patógenos oportunistas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Son causantes de infecciones del torrente sanguíneo, de vías urinarias, vías respiratorias y de heridas quirúrgicas (Ridderberg *et al.*, 2015b; Parkins y Floto 2015).

2.2.2 *Burkholderia* spp.

El género *Burkholderia* pertenece al subfilo de β -proteobacterias, inicialmente del género *Pseudomonas*. En 1992 fue incluido en la clase de Betaproteobacteria, en el orden Burkholderiales y la familia *Burkholderiaceae* como género *Burkholderia*. Estas bacterias son Gram negativos, en forma de bacilos rectos, móviles, con un metabolismo aeróbico. El complejo *Burkholderia cepacia* (CBC) está compuesto por más de 20 especies, anteriormente designados como genomovariantes, debido a su relación genética. *Burkholderia multivorans* y *Burkholderia cenocepacia* son especies del CBC clínicamente relevantes. *B. cenocepacia*, anteriormente denominado genomovariante III, se divide en cuatro linajes filogenéticos (IIIA, IIIB, IIIC y IIID) basados en el polimorfismo del gen *recA* (Abbott y Peleg 2015; Mannaa *et al.*, 2018). Fuera del CBC, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli* y *Burkholderia plantarii* pueden ser patógenas en humanos, animales y plantas. En humanos, los miembros del CBC (específicamente *B. multivorans* y *B. cenocepacia*) son patógenos oportunistas causantes de infecciones en pacientes con fibrosis quística (FQ), la cuales es

una enfermedad granulomatosa crónica. También se pueden presentar frecuentemente en infecciones de tracto respiratorio de pacientes inmunocomprometidos y en el sistema circulatorio de pacientes críticos en la UCI (Horsley y Jones 2012; Wallner *et al.*, 2019).

2.2.3 *Stenotrophomonas* spp.

El género *Stenotrophomonas* se clasificaba originalmente dentro del género *Pseudomonas*, luego *Xanthomonas*, y finalmente fue reclasificado como *Stenotrophomonas*. Pertenece al grupo Gammaproteobacteria y a la familia *Lysobacteraceae* [*Xanthomonadaceae*] y en la actualidad comprende más de 20 especies. El grupo *Stenotrophomonas maltophilia* comprende *Stenotrophomonas forensis*, *Stenotrophomonas hibiscicola*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Stenotrophomonas seipilia* (Nguyen *et al.*, 2024). Estas bacterias son bacilos Gram negativos, no fermentadores de la lactosa. Están presentes en todo el mundo: se ha encontrado en plantas, suelo y agua (Abbott y Peleg 2015). Como patógenos oportunistas, principalmente *S. maltophilia*, son causantes de infecciones hospitalarias en pacientes inmunocomprometidos y con FQ, incluyendo infecciones respiratorias, de endocardio, y en hemodiálisis (Chang *et al.*, 2015).

2.3 Epidemiología y transmisión

Las especies de *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* y *Achromobacter* tienen distribución mundial y se encuentran en agua, suelo, rizosfera y en plantas. El Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY en un periodo de 6 años identificó 221,084 aislamientos bacterianos, incluyendo bacilos entéricos Gram negativos con frecuencia de 11.5%, de los cuales la mayoría (82.7%) eran especies de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Sin embargo, *S. maltophilia* representó el 59.2%, el CBC el 7.7% y *Achromobacter* spp. el 6.7% (Abbott y Peleg 2015). En Australia tropical, las infecciones por *S. maltophilia* en bacteriemias se reportan en más de 4,500 casos (1.6 %) y especies de *Achromobacter* con 0.2% (Porter *et al.*, 2013).

El problema se atribuye a opciones limitadas de antibióticos, control y uso desmedido su administración (Magill *et al.*, 2015). Se han reportado aislamientos causantes de IAAS, destacando *Escherichia coli* con 24.6%, *Klebsiella* spp. con 23.8% y *Staphylococcus*

aureus con 20.6%. Además, el 90.5% de estos aislamientos presentaba resistencia al menos a un antibiótico. Más de la mitad de los aislamientos resultaron ser bacilos Gram negativos, 25% de ellos resistentes a carbapenémicos y 50% a betalactámicos (Gashaw *et al.*, 2018). Otro estudio con aislamientos similares encontró porcentajes de *S. aureus* 17%, estafilococos coagulasa negativos 17%, *E. coli* 11%, *Klebsiella pneumoniae* 9% y *Enterococcus faecalis* 8%, con resistencia del 20% a carbapenémicos (Lake *et al.*, 2018). En la actualidad, en el continente americano las tasas de prevalencia se encuentran entre el 4% y el 11.7%, principalmente en infecciones de tracto urinario, sitio quirúrgico y neumonía (Saleem *et al.*, 2019). En América del Norte, se reportó hasta un 30.6% en infecciones del torrente sanguíneo entre pacientes pediátricos (Le *et al.*, 2016). En Estados Unidos, la causa principal de IAAS fue por estafilococos coagulasa negativos (31.6%), seguida de *Enterococcus* (12.2%). Entre los países asiáticos, las especies más frecuentes fueron *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp (Kepenekli *et al.*, 2015). Más de la mitad de las IAAS son causadas por bacterias Gram negativas como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *Acinetobacter* spp. presentes en un 24.4% de infecciones en pacientes internados dentro de la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Phu *et al.*, 2016; Yallew *et al.*, 2016).

Dada la importancia a nivel hospitalario, distintos estudios caracterizan su diversidad genotípica para establecer su epidemiología molecular y transmisión. Aislamientos clínicos y ambientales de *S. maltophilia* obtenidos en un periodo entre 2016 y 2017 en México se agruparon en siete pulsotipos idénticos mediante PFGE (electroforesis en gel de campos pulsados, por sus siglas en inglés) (Cruz-Cordova *et al.*, 2020). En un estudio de Estados Unidos, se aislaron 71 aislamientos de *S. maltophilia* en el 2.6% de 2,699 pacientes con traumatismos (98.6%), heridas (80%) o de la UCI (81.4%). De estos, nueve pacientes tuvieron cultivos que produjeron 26 aislamientos en serie únicos (Patterson *et al.*, 2020).

A lo largo del tiempo se mantiene la prevalencia en infecciones de pacientes con FQ de *P. aeruginosa* hasta en 80%, *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina hasta 60%, y prevalencia baja del 3–5% del CBC. Sin embargo, hay un aumento de prevalencia de *S. maltophilia* hasta del 15 %, *A. xylosoxidans* del 8%, micobacterias no tuberculosas del 13% y *S. aureus* resistente a la meticilina hasta un 17.2% (Parkins y Elborn 2011). En un

centro francés, la incidencia de *Pseudomonas* fue del 59%, *S. maltophilia* 18.9%, *B. cenocepacia* 13.8% y *A. xylooxidans* 6.9% en infecciones en pacientes con FQ. En un estudio de Australia y Nueva Zelanda, se identificó *B. multivorans* en 29.3% y *B. cenocepacia* en 45.7% (Abbott y Peleg 2015).

La tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés) ha permitido determinar varias especies y genogrupos de *Achromobacter* diferentes (Ridderberg *et al.*, 2012; Spilker *et al.*, 2013). En un estudio de prevalencia en Canadá se identificó que un 89% de los pacientes estaban infectados por *Achromobacter* spp. y se determinó que no hubo transmisión mediante PFGE (Edwards *et al.*, 2017). De igual forma, en otro estudio también se determinó que ninguna de las muestras de esputo analizadas, albergaba colonias con perfiles de PFGE idénticos (Dupont *et al.*, 2017).

Las IAAS causadas por el CBC son de importancia clínica, ya que éste es un patógeno relevante y transmisible entre pacientes hospitalizados y con afección de FQ. En un hospital de Texas en 108 pacientes de la UCI, de 2 meses de nacimiento a 85 años, se cultivaron muestras del tracto respiratorio, sangre, orina, y de catéter intravenoso. El 40% correspondió a cultivos positivos de CBC, el 33% en infecciones del torrente sanguíneo. De estos, el 22% de los individuos pertenecían a dos grupos de cepas relacionadas mediante PFGE (Glowicz *et al.*, 2018).

En la actualidad, la transmisión de persona a persona de estos patógenos sigue siendo una preocupación. A diferencia del CBC, donde la evidencia de transmisión cruzada está bien caracterizada, se conoce menos de la transmisión de *S. maltophilia* y *A. xylooxidans*.

2.4 Importancia clínica

Estas bacterias Gram negativas son capaces de causar una gran variedad de infecciones, incluyendo bacteriemia, neumonía, meningitis, infecciones del tracto urinario, entre otras. También son capaces de causar IAAS a partir de fuentes ambientales contaminadas. Presentan mayor importancia entre poblaciones de pacientes que padecen FQ. En la actualidad, hasta un 10% de especies de *Achromobacter* persisten en infecciones del tracto respiratorio de pacientes con FQ (LiPuma 2010). Dentro de este género, *A. xylooxidans* en su mayoría se presenta en pacientes con FQ hasta 62.5% en infecciones persistentes (De Baets *et al.*, 2014; Edwards *et al.*, 2017).

Las especies del género de *Burkholderia* por lo general suelen ser virulentos, transmisibles y resistentes a múltiples clases antibióticos (El Chakhtoura *et al.*, 2017). Se conocen como “síndrome de cepacia” a los casos con infección neumónica fulminante e insuficiencia respiratoria, y septicemia. Las infecciones por el CBC se han asociado con frecuencia con brotes nosocomiales en fuentes de infección como soluciones nebulizadoras, enjuagues bucales, dispositivos médicos y soluciones intravenosas contaminados y catéteres intravasculares (Antony *et al.*, 2016; Righi *et al.*, 2013). También pueden contaminar soluciones desinfectantes como la clorhexidina (Ko *et al.*, 2015).

Por otro lado, *S. maltophilia* se ha reportado con una mortalidad de hasta del 50% en pacientes con neoplasias hematológicas (Cho *et al.*, 2015). Además, se ha mostrado un aumento en la mortalidad por bacteriemia por *S. maltophilia* desde 2014 hasta 2017 (Osawa *et al.*, 2018). También se han reportado las características clínicas de infecciones del torrente sanguíneo y episodios de neumonía en pacientes con cáncer causadas por *S. maltophilia* (Velazquez-Acosta *et al.*, 2018).

2.5 Identificación y diagnóstico

Los tres microorganismos tienen requisitos de crecimiento similares, pueden tener una apariencia similar en medios de cultivo estándar y todos pueden identificarse erróneamente entre sí y como especies de *Pseudomonas*. Son bacilos Gram negativos, aerobios, no fermentadores de lactosa en agar MacConkey, móviles, catalasa positiva, oxidasa positiva (con excepción de *S. maltophilia* que en mayor frecuencia suele ser oxidasa negativa; oxidasa positiva en un 20%), indol negativo, ureasa negativa y producción de H₂S negativa.

Actualmente la identificación automatizada mediante diferenciación bioquímica como API 20 y Vitek-2 han demostrado errores de identificación. Así mismo, técnicas modernas de identificación de laboratorio, como la espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés) pueden complementar y potencialmente reemplazar la identificación fenotípica que permitan identificar y discriminar bien estos organismos (Chen *et al.*, 2015; Ford y Burnham 2013; Wolk y Clark 2018).

La capacidad de las versiones actuales de los instrumentos MALDI-TOF MS para discriminar rutinariamente entre las especies dentro del CBC requiere más trabajo, pero es importante identificar con precisión *B. cenocepacia*. Desde la década de los 90s se encontró heterogeneidad entre cepas de *B. cepacia* aisladas de diferentes fuentes ecológicas. Esto complicó la identificación entre cepas de *B. cepacia* ya que géneros como *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* y *Delftia*, están estrechamente relacionados con *Burkholderia*. De manera similar, *Burkholderia humptydooensis* y *B. pseudomallei* interfieren en la identificación correcta del CBC (Devanga Ragupathi y Veeraraghavan 2019).

Hasta la fecha, se han utilizado diferentes composiciones de medios para aislar selectivamente el CBC. Esto incluye medio de *Pseudomonas cepacia* (agar PC) que contiene polimixina B y ticarcilina; agar de oxidación-fermentación con lactosa, polimixina B y bacitracina, y agar selectivo para *B. cepacia* (BCSA) compuesto de lactosa y sacarosa con base enriquecida de caseína y extracto de levadura con polimixina B, gentamicina y vancomicina (Devanga Ragupathi y Veeraraghavan 2019).

Por otro lado, la capacidad de identificar y diferenciar correctamente las especies de *Achromobacter* es de gran importancia, principalmente *A. xylosoxidans*. Además, es importante diferenciar de especies Gram negativas aerobias no fermentadoras fenotípicamente similares y genotípicamente relacionadas ya que presentan problemas importantes en infecciones del tracto respiratorio (Ridderberg *et al.*, 2015; Trancassini *et al.*, 2014).

2.6 Resistencia antimicrobiana

Una característica común de estos tres organismos es el gran número de mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia a los antibióticos. La presencia de β -lactamasas intrínsecas, sistemas de bombas de eflujo, modificaciones enzimáticas, cambios en la membrana externa y modificación del sitio diana son sólo algunos.

2.6.1 *Achromobacter*

2.6.1.1 Mecanismos de resistencia en *Achromobacter*

Las cepas de *Achromobacter* spp. son intrínsecamente resistentes a aminoglucósidos, cefalosporinas y aztreonam (Almuzara et al., 2010). En cepas de *Achromobacter* obtenidas de pacientes con FQ se ha reportado alta frecuencia de resistencia a aztreonam (88.4%), gentamicina (87.0%), tetraciclina (84.1%), amikacina (73.9%) y ceftriaxona (68.1%) (Filipic et al., 2017).

La resistencia intrínseca a los β -lactámicos es mediada por β -lactamasas de clase D, tal como OXA-114, OXA-243, y OXA-2, cefalosporinasas como bla_{ampC}, una β -lactamasa Ambler Clase C, enzimas modificadoras de cloranfenicol, aminoglucósidos y las bombas de eflujo de múltiples fármacos tipo RND (*resistance-nodulation-cell division*). La resistencia intrínseca a aminoglucósidos es mediada por modificación enzimática de AAC (6')-Ib y aadA1. La resistencia a cefalosporinas, aztreonam, fluoroquinolonas, cloranfenicol, carbapenémicos, tetraciclinas y eritromicina es mediada por sistemas de bombas de eflujo tipo ARN AxyABM y AxyXY-OprZ (AxyA y OprM) (Bador et al., 2013; Bador et al., 2011; Nielsen et al., 2017).

La resistencia adquirida a los β -lactámicos suele estar codificada por genes transportados por elementos genéticos móviles como integrones, que incluyen genes de carbapenemasas de tipo bla_{IMP-1}, bla_{IMP-10}, and bla_{IMP-19} (Doi et al., 2008; Ridderberg et al., 2015; Yamamoto et al., 2012), bla_{VIM-1}, bla_{VIM-2}, bla_{VEB-1}, y bla_{TMB-1} (El Salabi et al., 2012).

2.6.1.2 Farmacorresistencia en *Achromobacter*

Se ha informado la susceptibilidad en aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp. donde la mayoría de los aislamientos correspondían a infecciones en sangre. La susceptibilidad *in vitro* de piperacilina-tazobactam, meropenem, ceftazidima, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SXT), minociclina y colistina mostró ser efectiva al momento de tratar esta infección. Un estudio evaluó la susceptibilidad *in vitro* de imipenem, piperacilina-tazobactam, TMP-SXT y ceftazidima siguiendo los criterios por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), mostró el 100% de susceptibilidad de imipenem y piperacilina-tazobactam en la mayor parte de las cepas analizadas (Wood

et al., 2018). También se han analizado perfiles de susceptibilidad *in vitro* para piperacilina-tazobactam, meropenem, ceftazidima y TMP-SXT. Se encontró que los aislamientos eran más susceptibles a piperacilina-tazobactam con 97% (Swenson & Sadikot, 2015). El ertapenem es el antimicrobiano frecuentemente eficaz *in vitro* contra *A. xylosoxidans* (Almuzara *et al.*, 2010). Por otro lado, las combinaciones de inhibidores de la β -lactamasa no han mostrado tener una actividad antimicrobiana significativa contra *A. xylosoxidans*.

2.6.1.3 Opciones de tratamiento en *Achromobacter*

Se ha identificado que el tratamiento de elección con TMP-SXT e imipenem son los antibióticos más utilizados para *Achromobacter* (Wood *et al.*, 2018). En España se encontró que aislamientos de *A. xylosoxidans* son susceptibles al meropenem hasta un 92% y piperacilina-tazobactam con 77% de los aislamientos analizados, siguiendo los puntos de corte establecidos por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST) (Perez Barragan, Sandino Perez, Corbella, Orellana, & Fernandez-Ruiz, 2018).

Hasta el momento los datos son limitados sobre el tratamiento clínico, ya que se analiza en gran parte la susceptibilidad *in vitro* de *Achromobacter* a diferentes agentes antimicrobianos lo que sugiere que la piperacilina-tazobactam, carbapenémicos, ceftazidima o TMP-SXT sean considerados como opciones de tratamiento empírico de primera línea. La minociclina es otra alternativa de tratamiento activa en ensayos *in vitro* contra *Achromobacter* (Abbott & Peleg, 2015). Por otra parte, los inhibidores de β -lactámicos y β -lactamasas no muestran perfiles de susceptibilidad *in vitro*. El cefiderocol, una cefalosporina con sideróforo que es estable frente a serina y metalo β -lactamasas, se ha utilizado con éxito en infecciones por *Achromobacter* spp., pero faltan resultados específicos confirmatorios.

2.6.2 *Burkholderia*

2.6.2.1 Mecanismos de resistencia en *Burkholderia*

En la actualidad, los antibióticos β -lactámicos son recomendados como una opción terapéutica para tratar las infecciones por *B. cepacia* y *B. pseudomallei*. Más de seis

bombas eflujo de RND desempeñan un papel en la resistencia dirigida a β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, fluoroquinolonas y TMP-SXT. Sin embargo, la expresión de β -lactamasas genera resistencia a estos antibióticos, así como la expresión de proteínas de unión a penicilina en cepas de *B. pseudomallei*. *Burkholderia* spp. contiene β -lactamasas, una carbapenemasa Clase A de Ambler PenB en *B. cepacia* y PenA en *B. multivorans*, una β -lactamasa AmpC Clase C intrínsecas y PenI de clase A resistente a inhibidores codificada por cromosomas (Papp-Wallace *et al.*, 2017). Las β -lactamasas Ambler Clase A y Clase C son inducibles y no se expresan constitutivamente, además, algunas cepas también producen β -lactamasas clase D de Ambler (Rhodes & Schweizer, 2016). Los genes *penB*, *ampC*, *gyrA*, *wbaD*, *BDAG_01161*, y *fixL* se han implicado en la resistencia a los antibióticos (Sousa *et al.*, 2017) y las enzimas AmpD de la pared celular (Abbott y Peleg 2015). Las bombas de eflujo se han relacionado con la resistencia a aminoglucósidos, ciprofloxacina, trimetoprim, cloranfenicol por enzimas modificadoras de aminoglucósidos como dihidrofolato reductasa. Además, cambios en la membrana externa modificando los sitios de unión en la capa de lipopolisacáridos (LPS) confieren resistencia intrínseca a las polimixinas y aminoglucósidos (Podnecky *et al.*, 2015). Por último, la resistencia a β -lactámicos y fluoroquinolonas también puede ser ocasionada por modificaciones en el sitio diana, con el cambio en las proteínas de unión a penicilina y mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas (*gyrA* y *parC*) (Rhodes & Schweizer, 2016).

2.6.2.2 Farmacorresistencia en *Burkholderia*

Las especies del CBC son intrínsecamente resistentes a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y polimixinas. Sin embargo, ciertos β -lactámicos como ceftazidima y meropenem, a menudo son activos ya que las β -lactamasas PenA y PenB no son expresadas constitutivamente por CBC. Pero, si se inducen estas β -lactamasas, se presenta resistencia hacia cefalosporinas de amplio espectro y carbapenémicos. También TMP-SXT y minociclina son activos contra los aislamientos de CBC (Frost, Shaw, & Nazareth, 2021). Meropenem, ceftazidima y minociclina son activos con hasta un 87% de susceptibilidad. Un estudio en el Reino Unido con pacientes en tratamiento con TMP-SXT y ceftazidima, mostraron porcentajes de 38.5% y 22.9% de susceptibilidad

respectivamente, contra aislamientos de *B. cenocepacia*, a su vez un tratamiento con minociclina y TMP-SXT fueron los más susceptibles contra aislamientos *B. multivorans* (F. K. Abbott, Milne, Stead, & Gould, 2016). La alta tasa de resistencia ha suscitado el interés por el uso de combinaciones entre β -lactámicos/ β -lactamasas para tratar las infecciones por CBC. Se ha evaluado la actividad ceftazidima-avibactam en infecciones de pacientes con FQ (Papp-Wallace *et al.*, 2017). El avibactam formó un complejo estable con PenA y restauró la actividad antimicrobiana contra cepas resistentes a ceftazidima con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ y $4 \mu\text{g/ml}$ de avibactam. Otro grupo de estudio evaluó la susceptibilidad *in vitro* de ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam en cepas del CBC, con puntos de corte establecidos por el EUCAST (Van Dalem *et al.*, 2018). En aislamientos del CBC, una nueva combinación de ceftazidima-avibactam y piperacilina-tazobactam ha mostrado una actividad antimicrobiana prometedora, ya que la piperacilina inhibe la AmpC expresada en los aislamientos mediante hidrólisis lenta, mientras que el avibactam inhibe la PenA. Esta combinación mostró una susceptibilidad *in vitro* en 150 de 151 aislamientos CBC resistentes a ceftazidima-avibactam. Los puntos de corte CLSI para piperacilina-tazobactam se basaron en los de *Pseudomonas aeruginosa* y los puntos de corte para ceftazidima-avibactam se basaron en los de ceftazidima para CBC. Ningún estudio publicado ha evaluado la eficacia clínica de la combinación (Zeiser *et al.*, 2019).

2.6.2.3 Opciones de tratamiento en *Burkholderia*

Existen pocos datos al respecto sobre el tratamiento clínico en infecciones por CBC. No hay pruebas suficientes para determinar la estrategia más eficaz para eliminación de infecciones por CBC (Frost, Shaw, & Nazareth, 2019; Horsley & Jones, 2012). Otros estudios muestran que el organismo fue erradicado solo en siete pacientes, tres sin ninguna terapia y los otros cuatro pacientes recibieron combinaciones de minociclina, TMP-SXT, meropenem, aztreonam, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam y tobramicina (Gautam *et al.*, 2015). La combinación de ceftazidima-avibactam ha logrado la erradicación de un caso de bacteriemia en un paciente de 2 meses (Tamma *et al.*, 2018). Por lo tanto, TMP-SXT, meropenem y ceftazidima son antimicrobianos de primera línea contra este agente

patógeno, y las combinaciones como alternativa incluyen minociclina y ceftazidima-avibactam, pero sin un gran número de evidencia clínica.

2.6.3 *Stenotrophomonas*

2.6.3.1 Mecanismos de resistencia en *Stenotrophomonas*

La resistencia en *S. maltophilia* es causada por diversos mecanismos moleculares que limitan el uso de un gran número de antimicrobianos. Mecanismos como la transferencia de genes asociados a resistencia, como elementos ISCR y genes *sul*, transposones y la presencia de bombas de eflujo. Estas bombas de eflujo incluyen la familia RND, la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y transportadores ABC “casete de unión de ATP”. Las bombas eflujo tipo RND producen resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, TMP-SXT y cloranfenicol. Los transportadores ABC confieren resistencia para fluoroquinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos. Las bombas de tipo MFS pueden provocar resistencia a tetraciclinas producido por su sobreexpresión y mutaciones. De manera similar, la sobreexpresión de bombas SmeDEF, y SmeABC desempeñan un papel dentro de la resistencia adquirida (Wu et al., 2019). SmrA confiere resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y fluoroquinolonas. Otros mecanismos de resistencia es la producción de β -lactamasas inducibles cromosómicamente como una metalo- β -lactamasa Ambler Clase B, L1, y una serina β -lactamasa Ambler Clase A, L2. L1 hidroliza todos los antibióticos β -lactámicos disponibles, excepto aztreonam (Brooke, 2012). L2 es una cefalosporinasa que hidroliza muchas cefalosporinas, penicilinas y aztreonam (Flores-Treviño et al., 2014; Mojica et al., 2016). Aunque el clavulanato y el avibactam logran inhibir la L2, los inhibidores de la sulfona β -lactamasa sulbactam y tazobactam generalmente no inhiben la L2. Además, cuando L1 y L2 se expresan en conjunto, la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, incluidos nuevas combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasa, no son eficientes (Y. T. Huang et al., 2018). La resistencia a aminoglucósidos y quinolonas intrínsecas de bajo nivel es causada por enzimas modificadoras de aminoglucósidos y la enzima topoisomerasa Smqnr y la fosfoglucomutasa (SpgM). La resistencia a fluoroquinolonas y TMP-SXT es causada por la modificación del sitio diana mediante topoisomerasas Smgnr e integrones de clase 1, Sul1 y Sul2 (Chang et al., 2015).

2.6.3.2 Farmacorresistencia en *Stenotrophomonas*

S. maltophilia frecuentemente es resistente a los β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas *in vivo* e *in vitro*. El fármaco de elección para tratar las infecciones por este patógeno con más efectividad ha sido la administración de TMP-SXT y, según resultados entre 2013 y 2016 del Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY, la susceptibilidad es superior al 95% en todo el mundo. Los antimicrobianos alternativos con alta susceptibilidad *in vitro* incluyen minociclina con una CMI de $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, y levofloxacino $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ según los parámetros establecidos por el CLSI (Gales *et al.*, 2019). Entre β -lactámicos, la ceftazidima es el antimicrobiano de elección con mayor frecuencia, pero no es una opción de monoterapia confiable. Además, debido a la hiperproducción de L1 y L2 a través de mutaciones de sitio único que regulan positivamente su expresión los aislamientos resultan ser resistentes (Calvopina *et al.*, 2017; Zhanel, Baxter, Adam, Sutcliffe, & Karlowsky, 2018). Los reportes que indican perfiles de resistencia y susceptibilidad en combinación de β -lactámicos y β -inhibidores de lactamasa, no resultan ser confiables contra *S. maltophilia*, en comparación con la combinación de aztreonam y clavulanato o avibactam eficientes al menos en la evidencia *in vitro*. Aztreonam, dentro de su mecanismo no es hidrolizado por L1, pero es fácilmente hidrolizado por L2. El clavulanato o avibactam inhiben L2, esto restaura la actividad de aztreonam. El papel de las combinaciones basadas en vaborbactam se ha evaluado, con aislamientos clínicos de *S. maltophilia* resistentes a TMP-SXT y levofloxacino, frente a la combinación aztreonam con ceftazidima-avibactam o meropenem-vaborbactam, de los cuales 36 de los 37 aislamientos fueron resistentes para aztreonam, en comparación la combinación de avibactam y vaborbactam resultó en 14% de susceptibilidad en aislamientos resistentes (Mojica *et al.*, 2017).

Por otro lado, el uso del cefiderocol tiene actividad *in vitro* contra bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos. Este antibiótico se ha evaluado de manera *in vitro* frente aislamientos de *S. maltophilia* donde se presenta una susceptibilidad del 99.8% con una CMI de $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ (Rolston *et al.*, 2020; Spencer, Spitznogle, Borjan, & Aitken, 2020).

2.6.3.3 Opciones de tratamiento en *Stenotrophomonas*

En la actualidad el TMP-SXT es el tratamiento de primera línea para infecciones por *S. maltophilia*. La resistencia hacia este fármaco puede requerir otras opciones de tratamiento como levofloxacino, minociclina o tigeciclina. Se ha evaluado la eficacia de fluoroquinolonas como el levofloxacino frente a TMP-SXT en el tratamiento para infecciones causantes por *S. maltophilia* (Ko et al., 2019). Estudios han evaluado monoterapias con minociclina contra a TMP-SXT en pacientes con al menos un cultivo positivo para *S. maltophilia* en un periodo de 6 años de un hospital en Texas, que incluyeron 45 pacientes, 23 tratados con minociclina y 22 con TMP-SXT, no hubo diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes tratados (Hand, Davis, Kim, & Duhon, 2016). La tigeciclina, similar a las tetraciclinas, es otra alternativa de tratamiento potencial, sin embargo, en un estudio donde se incluían aislamientos de *S. maltophilia* en infecciones de diferentes sitios por paciente, no hubo diferencias en la tasa de mortalidad (Tekce, Erbay, Cabadak, & Sen, 2012). Aunque estos estudios sugieren que la minociclina, la levofloxacina y la tigeciclina pueden ser alternativas, todos los estudios están sujetos a una desproporción significativa, incluido selección de pacientes, tamaños de muestra y definiciones de resultados subjetivos. Por lo tanto, el TMP-SXT todavía se considera el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia*, y las alternativas se utilizan cuando el escenario clínico lo justifica.

Por último, el uso potencial de cefiderocol contra infecciones de *S. maltophilia* no han reportado resultados altamente significativos, al menos atribuible para el tratamiento de infecciones graves por *S. maltophilia* a menos que realmente no haya antimicrobianos alternativos disponibles.

2.7 Factores de virulencia

2.7.1 Biopelícula

Uno de los factores de virulencia importantes de estos organismos es su capacidad para producir y supervivencia dentro de biopelículas. Las biopelículas son agregados de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), compuesta de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Se han asociado con la resistencia ante factores ambientales y provee la unión en algunas superficies, resistencia a la actividad fagocítica y otros factores

inmunes, que protege contra la actividad antimicrobiana. El paso inicial en el desarrollo de biopelículas es la adhesión de las células a una superficie y este evento depende de apéndices proteicos superficiales especializados, como fimbrias o flagelos, que pueden actuar como adhesinas. El desarrollo de estas ocurre en cuatro pasos: anclaje inicial reversible, anclaje irreversible, maduración y dispersión. El primer paso consiste en la adhesión de bacterias planctónicas a la superficie. Una vez anclada, se forma una monocapa bacteriana y se produce una matriz extracelular de protección. Esta matriz consta de polisacáridos extracelulares, proteínas extracelulares, restos celulares y ácidos nucleicos. El ADN extracelular es el primer compuesto que aparece durante la formación de la matriz, mientras que los polisacáridos y las proteínas estructurales aparecen después. Una vez formada, la matriz favorece el crecimiento bacteriano y la comunicación célula-célula, esta última conocida como *quorum sensing*. Las biopelículas crecen en forma tridimensional, y en este momento, la adhesión a la superficie es irreversible. En el último paso, algunas células ya maduras empiezan a desunirse y dispersarse nuevamente por el ambiente como células planctónicas para comenzar un nuevo ciclo (Jakobsen, Bjarnsholt, Jensen, Givskov, & Hoiby, 2013; Saxena, Banerjee, Garg, & Singh, 2014; Van Acker et al., 2013).

2.7.1.1 Biopelícula en *Achromobacter*

En *Achromobacter* spp. se ha reportado la expresión de exopolisacáridos, la excreción de componentes de la matriz extracelular, el aumento de la actividad de las bombas que regulan positivamente la capacidad de formar biopelículas. Esta característica es importante en el establecimiento y mantenimiento de infecciones (Nielsen *et al.*, 2016). Se ha reportado la presencia de genes asociados a biopelícula, como *kdpD* en aislamientos de *A. xylosoxidans*, que confieren una colonización crónica del pulmón, *rcaB*, *rmlA* (glucosa-1-fosfato timidililtransferasa) y *rmlC* (dTDP-4-deshidrorhamnosa 3,5-epimerasa), también se ven implicados en la pared celular (Ridderberg *et al.*, 2015). La expresión génica en la biopelícula de exopolisacáridos contribuyen a la formación de la matriz extracelular. La expresión del gen *epsF*, que codifica la biosíntesis de exopolisacáridos, y transportadores ABC de polisacárido capsular, *KpsT*, *KpsE* y *KpsM*, aumentan el crecimiento bacteriano dentro de la biopelícula. El complejo transportador ABC (*KpsT/KpsM*) exporta polisacáridos a través de la membrana citoplasmática y, por

lo tanto, contribuye al aumento de la generación de componentes de la matriz extracelular de la biopelícula de *Achromobacter* (Nielsen, Penstoft, & Norskov-Lauritsen, 2019). Otros factores como la biosíntesis de metionina que depende de la asimilación del azufre por la vía del sulfato, la cisteína funciona como donante de azufre en la biosíntesis de metionina, y esta es catalizada por la cistationina beta-liasa (MetC). La hiper-expresión de este gen durante el crecimiento bacteriano, además de desempeñar un papel putativo en la respiración anaeróbica, podría ser importante para el establecimiento de la biopelícula de *Achromobacter* (Nielsen et al., 2019).

2.7.1.2 Biopelícula en *Burkholderia*

De igual forma, la capacidad para formar biopelículas de aislamientos de *Burkholderia* spp. principalmente en pacientes con FQ y con catéteres intravasculares (Papp-Wallace *et al.*, 2013), genera mayor complejidad su tratamiento. Los genes que favorecen la formación de biopelícula son *rpfF* y *rpfB* (Suppiger *et al.*, 2013). Existe evidencia que sugiere que el sistema QS juega un papel importante en el desarrollo de biopelículas. La matriz de la biopelícula puede actuar como barrera de difusión para moléculas de señal, que crea un entorno ideal para la señalización de QS. Estas señales codificadas por un sistema de detección de quórum dependiente de N-acil homoserina lactona (AHL) que consiste en una AHL sintasa que dirige la síntesis de N-octanoil-l-homoserina lactona (ohl) y n-hexanoil-l-homoserina lactona y un regulador transcripcional. El sistema CepIR controla la formación de biopelículas en la mayoría de las cepas del CBC. En un estudio se demostró que la inactivación de *cepI* o *cepR* perjudica la maduración de la biopelícula y producía biopelículas más delgadas. También se ha identificado tipos de pilis en cepas del CBC: malla (Msh), filamentosa (Fil), espina (Spn), espiga (Spk) y pili de cable (Cbl). El pili de cable Cbl tiene un papel importante en la adhesión a las células epiteliales. En *B. cenocepacia* se identificó el gen H111, que codifica un homólogo del pilus de *E. coli* FimA tipo I y se demostró que está controlado por el sistema CepIR. En *B. pseudomallei* el gen *pilA*, que codifica para un pili de tipo IV, se demostró ser necesario para el desarrollo de microcolonias pero no para adherencia a las células humanas. Además del gen *bapA*, que codifica para la proteína asociada a la biopelícula (BAP, por sus siglas en inglés) *BapA*, que pertenece a una familia de proteínas de superficie que se secretan a

través de un sistema de secreción tipo I y permanecen débilmente asociadas con la superficie celular. Se ha demostrado que *BapA* es de crucial importancia para la formación de biopelículas en superficies abióticas, influyendo tanto en la arquitectura como en la biomasa de la biopelícula. Es importante destacar que se descubrió que la expresión de *bapA* estaba controlada por el sistema CepIR. También el EPS es producido por la mayoría de las especies de CBC. Dos grupos de genes, *bce-I* y *bce-II*, codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis *B. cepacia*. Y, aunque se ha demostrado que la producción de EPS está controlada por un sistema QS dependiente de AHL en especies de *Burkholderia* asociadas a plantas, no hay evidencia de que este también se genere en miembros del CBC (Suppiger, Schmid, Aguilar, Pessi, & Eberl, 2013).

2.7.1.3 Biopelícula en *Stenotrophomonas*

Una característica principal de las cepas de *S. maltophilia* es la producción de biopelícula, con capacidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas, como el plástico y el vidrio. En infecciones de pacientes inmunocomprometidos y afecciones respiratorias, la formación de la biopelícula ayuda a ejercer su colonización y así modular su farmacoresistencia creando una gran importancia dentro del entorno hospitalario debido a la cantidad de infecciones adquiridas. En la actualidad se reporta hasta un 100% de producción de biopelícula en aislamientos clínicos presentes en hospitales de México (Montoya-Hinojosa *et al.*, 2020).

De la misma manera esta bacteria exhibe factores de virulencia que se ven asociados en la producción de biopelícula, ya mencionados previamente que incluyen LPS, fimbrias, adhesinas y flagelos. En estos LPS se ven involucrados productos génicos que están implicados en la formación de intermediarios de LPS y exopolisacáridos presentes en la membrana externa de la célula bacteriana (Trifonova & Strateva, 2019). El gen *spgM* un homólogo del gen *algC*, codifica una enzima bifuncional con actividades de fosfoglucomutasa y fosfomanomutasa involucradas en la producción de LPS en *S. maltophilia*. Genes como *rmlA*, *rmlC* y *xanB* están implicados en el biosintético acoplado a LPS/exopolisacáridos. Los genes *rmlC* y *rmlA* son necesarios para la biosíntesis del antígeno O del LPS, junto a *xanB*, pero este además es necesario para la biosíntesis del núcleo del LPS (Zhuo *et al.*, 2014). Se ha determinado la presencia de genes asociados a

la producción de biopelícula como *fsnR*, codifica la biosíntesis del flagelo que activa la transcripción de genes flagelares, *rmlA*, codifica una glucosa-1-fosfato *timidil* transferasa, y *xanB*, codifica una fosfomanoseisomerasa/GDP-manosepirofosforilasa, necesarias para la biosíntesis del LPS O-antígeno, con una frecuencia de hasta 80% (Bostanghadiri *et al.*, 2019; Willsey *et al.*, 2019,).

Las fimbrias como (SMF-1) que codifica el gen *smf-1* modulan la adherencia de *S. maltophilia* a células epiteliales y son partícipes en la promoción de la unión íntima a la superficie, lo que ayuda a la formación de biopelículas (Trifonova & Strateva, 2019). Por otro lado, las estructuras responsables de la motilidad bacteriana, los flagelos participan en la adherencia de las bacterias a diversas superficies. Alrededor de 20 genes están involucrados con su estructura y regulación flagelar. El gen *fsnR* es un regulador de la biosíntesis del flagelo que se une a los promotores de genes flagelares y activa su transcripción, regulando así la biosíntesis flagelar y la motilidad celular (X. M. Kang, Wang, Zhang, Zhang, & Qiana, 2015). El gen *bsmR* es regulador de la motilidad de natación asociado a el factor de transcripción *BsmT* que regula la transcripción relacionada con la producción de biopelícula y la motilidad de natación. Este gen *bsmT* se une a la región promotora del operón y activa la expresión de *bsmR*. El gen *bsmR* degrada el segundo mensajero bis-3', 5'-monofosfato de diguanosina cíclico (c-di-GMP) a través de su dominio EAL y activa la expresión de *fsnR* (Liu et al., 2017). Genes como el gen *fliI* y *fliA* se ven involucrados en la síntesis de la expresión de los flagelos, que codifica una ATPasa asociada a flagelos y un factor sigma involucrado en la regulación de la transcripción del gen flagelar, respectivamente (X. M. Kang et al., 2015). La proteína Hfq regula la expresión de genes que codifican componentes flagelares y fimbriales (Roschetto et al., 2012). La proteína FleQ regula la expresión del gen flagelar al unirse a la ATPasa FleN putativa (Yang et al., 2014)

Es por esto, por lo que la elección de un tratamiento eficaz contra *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp., y *Stenotrophomonas* spp. es complicada debido que los microorganismos cuentan con varios factores de virulencia, incluyendo la producción de biopelícula, y el aumento de las tasas de farmacorresistencia.

2.7.1.4 Farmacorresistencia causada por biopelícula

Las bacterias que forman biopelículas presentan una resistencia significativamente mayor a los fármacos antibacterianos en comparación con aquellas en estado planctónico (Olson, Ceri, Morck, Buret, & Read, 2002). Este fenómeno se debe en gran medida a la matriz extracelular polimérica (EPS, por sus siglas en inglés), que actúa como una barrera física restringiendo la entrada de diversos agentes antimicrobianos y modulando distintos sistemas reguladores. La matriz EPS no solo impide la penetración de moléculas, sino que también puede expulsarlas activamente, contribuyendo a la resiliencia de la biopelícula (Mosaddad et al., 2019). Además, la EPS puede inactivar la acción de los antibióticos mediante mecanismos específicos, tales como la inhibición de la difusión del fármaco y la degradación enzimática (Kaplan et al., 2018)

Los componentes fisiológicos de la biopelícula, como los nutrientes y el oxígeno que circulan a través de los canales de agua dentro de la EPS, desempeñan un papel clave en la resistencia a los antibióticos (Sharma, Misba, & Khan, 2019). Asimismo, la estructura de la biopelícula facilita la transferencia horizontal de genes entre microorganismos, lo que promueve el desarrollo de resistencia (Macia, Rojo-Molinero, & Oliver, 2014; Singh, Singh, Chowdhury, & Singh, 2017). Además, las biopelículas poseen múltiples mecanismos de tolerancia, incluyendo la impermeabilidad a ciertos antibióticos, un crecimiento diferencial, la formación de gradientes de nutrientes y la facilitación de la transferencia genética (Macia et al., 2014).

Estos factores hacen que las biopelículas constituyan un desafío significativo en el tratamiento de infecciones bacterianas, requiriendo estrategias terapéuticas innovadoras para superar su alta resistencia a los antibióticos.

2.7.1.5 Evaluación de la farmacorresistencia en células de biopelícula

Existen diversos métodos empleados para la detección y cuantificación de biopelículas bacterianas. A lo largo del tiempo, se han optimizado varios dispositivos utilizados como sistemas modelo, entre los cuales destacan el dispositivo de biopelícula de Calgary, el reactor de disco, el reactor de biopelícula del CDC y ciertos dispositivos médicos, como los catéteres urinarios (Lindsay, Killington, Fouhy, Loh, & Malakar, 2022). Cada dispositivo utiliza metodologías específicas para la evaluación de biopelículas. Por

ejemplo, el dispositivo de biopelícula de Calgary se basa en el recuento de unidades viables y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), donde las clavijas se someten a sonicación antes del recuento (Buret et al., 1999). Los métodos empleados en el reactor de disco y en el reactor de biopelícula del CDC también se fundamentan en el recuento viable y directo, con la sonicación de los sustratos como paso previo a la cuantificación. En el modelo de catéteres urinarios con sustratos de la vejiga, la evaluación se lleva a cabo mediante técnicas de microscopía electrónica, incluyendo la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), lo que permite una caracterización detallada de la estructura de la biopelícula (Kırmusaoğlu & methods, 2019).

En las infecciones en las que no se forman biopelícula, la terapia antimicrobiana se basa en la concentración mínima inhibitoria (CMI), que impide la proliferación de microorganismos y cuya eficacia depende del tiempo de exposición y de la respuesta inmunitaria del huésped para eliminar las células viables. Sin embargo, en las infecciones relacionadas biopelícula, es necesario utilizar concentraciones antimicrobianas considerablemente más altas para erradicar los microorganismos (Castaneda, McLaren, Tavaziva, & Overstreet, 2016). La concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB) y la concentración mínima de inhibición de la biopelícula (CMIB) permiten determinar *in vitro* la menor concentración antimicrobiana capaz de eliminar la totalidad de los microorganismos en una biopelícula, incluidas las células persistentes. Estas concentraciones pueden ser cientos o incluso miles de veces superiores a la CMI para el mismo par antimicrobiano-microorganismo. Desde una perspectiva clínica, la diferencia principal entre la CMI para bacterias en estado planctónico y la CMEB o CMIB para bacterias en biopelícula radica en que las células persistentes dentro de la biopelícula no pueden ser eliminadas por el sistema inmunológico del huésped. Para erradicar eficazmente infecciones asociadas a biopelículas, los niveles de antimicrobianos deben alcanzar al menos la CMEB (Nishimura, Tsurumoto, Yonekura, Adachi, & Shindo, 2006).

La determinación de la CMI se lleva a cabo exponiendo las bacterias a los antimicrobianos durante un período estandarizado de 24 horas. La terapia antimicrobiana sistémica mantiene concentraciones por encima de la CMI hasta que se logra la erradicación de la infección. No se ha identificado una necesidad crítica de evaluar si la

CMI variará con tiempos de exposición prolongados. En el tratamiento de infecciones por implantes asociadas a biopelículas, la administración local de antimicrobianos es una estrategia frecuente para mantener concentraciones constantes que disminuyen gradualmente con el tiempo. Es esencial determinar la concentración adecuada de antimicrobiano necesaria para eliminar todas las células persistentes y establecer la duración óptima de la administración local para alcanzar este objetivo. La determinación de la CMEB y la CMIB se realiza exponiendo biopelículas bacterianas a antimicrobianos durante un máximo de 24 horas. No obstante, aunque estas concentraciones pueden erradicar la biopelícula en ese período, no se ha esclarecido si un tratamiento de mayor duración requeriría la misma concentración antimicrobiana. La relación entre el tiempo de exposición, la CMEB y la CMIB aún no se comprende completamente (Fux, Wilson, & Stoodley, 2004; Girard, Ceri, Gibb, Olson, & Sepandj, 2010).

Diversos estudios han evaluado estas metodologías en múltiples microorganismos, incluidos los grampositivos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, así como los gramnegativos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha observado que los valores de CMEB son significativamente más altos que los de CMI. Además, la evidencia indica que los microorganismos en biopelículas son más susceptibles a los antimicrobianos cuando están expuestos a estos de manera continua y prolongada, lo que proporciona información clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces en el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas (Castaneda et al., 2016).

Estudios previos han evaluado la actividad del levofloxacin frente a cepas de *S. maltophilia* capaces de formar biopelículas. Dichos estudios han demostrado una diferencia significativa en la susceptibilidad antimicrobiana entre las células en su forma planctónica y aquellas productoras de biopelícula. Específicamente, se ha observado que los valores correspondientes a la CMEB son entre 50 y 100 veces más elevados que los de la CMI, lo que sugiere que la biopelícula presenta una resistencia considerablemente mayor en comparación con su contraparte planctónica (Pompilio, Crocetta, Verginelli, & Di Bonaventura, 2016).

El análisis de diversas cepas de *Burkholderia pseudomallei* reveló que las CMIB y las CMEB de los antibióticos ceftazidima, doxiciclina e imipenem fueron entre 2 y 1024

veces superiores en comparación con sus correspondientes CMI determinadas para las células en estado planctónico. (Sirijant, Sermswan, & Wongratanacheewin, 2016). Por otro lado, compuestos orgánicos como el farnesol demostró la capacidad de disgregar la matriz de la biopelícula, y la pérdida de la estructura (Castelo-Branco et al., 2016).

2.7.1.6 Estrategias de control

El desarrollo de estrategias innovadoras para el control de biopelículas es fundamental, especialmente debido al uso inadecuado y excesivo de antibióticos, lo que ha facilitado que las biopelículas desarrollen mecanismos de resistencia frente a los tratamientos antimicrobianos convencionales, provocando infecciones recurrentes (Algburi, Comito, Kashtanov, Dicks, & Chikindas, 2017; Jiao, Tay, Niu, & Chen, 2019).

Los antibióticos de uso oral, como los β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos, representan ejemplos destacados de fallos terapéuticos. Las β -lactamasas producidas por las bacterias descomponen estos compuestos, lo que impide su acción y dificulta su acceso a las biopelículas. Por su parte, las quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos son expulsados de las células bacterianas mediante mecanismos de eflujo. Además, la eficacia de las quinolonas se ve comprometida en el entorno anaeróbico característico de las biopelículas. A pesar de la complejidad que implica su tratamiento con antibióticos convencionales, se ha observado que ciertas clases de fármacos pueden actuar de manera efectiva cuando se administran en dosis adecuadas y de forma apropiada.

Antibióticos como las β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y antibióticos macrólidos administrados por vía oral son los principales ejemplos de fracasos del tratamiento. Las β -lactamasas bacterianas hidrolizan los β -lactámicos por lo que son ineficaces y no pueden penetrar las biopelículas. Las quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos son transportados fuera de las células bacterianas por bombas de eflujo. Además, las quinolonas no son más efectivas en el entorno anaeróbico de la biopelícula. Aunque son difíciles de tratar con la terapia antibiótica clásica, las biopelículas han demostrado susceptibilidad a ciertas clases de fármacos, cuando se administran correctamente y en dosis altas (Ciofu, Rojo-Molinero, Macia, & Oliver, 2017; Reza, Sutton, & Rahman, 2019).

La creación de nuevos antibióticos alternativos o incluso vacunas dirigidas a estos complejos biológicos podría contribuir a mitigar las infecciones crónicas asociadas a biopelículas. Las estrategias terapéuticas deben adaptarse a la etapa de desarrollo de la biopelícula, desde la adhesión inicial hasta su dispersión (Hobley, Harkins, MacPhee, & Stanley-Wall, 2015). La erradicación de biopelículas establecidas representa un reto considerable; no obstante, existen diversos métodos disponibles, como el uso de inhibidores de EPS, agentes que promueven la dispersión, inmunoterapias y técnicas de eliminación mecánica. En el ámbito clínico, se han implementado métodos de degradación de biopelículas maduras mediante aproximaciones físicas, biológicas, químicas y en combinación (Brown, Reuter, Hanman, Betts, & van Vliet, 2015; Jiang, Geng, & Bai, 2020).

La creciente resistencia de las biopelículas a los antibióticos tradicionales ha impulsado la investigación y el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento. Entre estos enfoques destacan el diseño de pequeñas moléculas capaces de interferir en factores de virulencia específicos, así como el uso de enzimas dirigidas a la matriz extracelular. Algunas enzimas, como la DNasa, la proteinasa K y la tripsina, han demostrado su capacidad para degradar el ADN extracelular (eADN) y desestabilizar la estructura de la biopelícula, lo que se ha observado en el caso de *Staphylococcus epidermidis* (Kuang, Chen, & Xu, 2018). Por otro lado, compuestos químicos como el benzimidazol y la N-acetilcisteína inhiben la producción de EPS y favorecen la disgregación de la biopelícula. Asimismo, la utilización de agentes quelantes que se unen a iones esenciales, como el calcio y el magnesio, ha mostrado eficacia al dificultar la adhesión microbiana a las superficies (H. Chen et al., 2020; Jiang et al., 2020).

La terapia con bacteriófagos ha emergido como una estrategia alternativa prometedora en el manejo de biopelículas. Este enfoque actúa mediante la disrupción de la matriz de EPS, lo que conduce a la desintegración de la biopelícula. Donde, se ha resaltado la importancia de esta terapia en el control de las biopelículas, abriendo nuevas perspectivas para su aplicación en el tratamiento de infecciones persistentes en entornos clínicos (Dickey & Perrot, 2019; Pires, Melo, Vilas Boas, Sillankorva, & Azeredo, 2017).

3. Justificación

En la actualidad, los bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa son causantes de una alta tasa de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), con alta morbilidad y mortalidad. Dentro de este grupo de bacterias se encuentran *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp., los cuales están tomando más importancia clínica. Estos importantes patógenos oportunistas, poseen multifarmacorresistencia y factores de virulencia como la producción de biopelícula. Este fenómeno resulta especialmente relevante en el contexto hospitalario, ya que estas bacterias pueden adherirse a superficies de dispositivos médicos como catéteres, válvulas y prótesis, donde la biopelícula fomenta la persistencia y cronicidad de las infecciones

A pesar de la importancia clínica de estos bacilos Gram negativos existen escasos estudios en México de la farmacorresistencia, los factores de virulencia y la epidemiología de estos bacilos Gram negativos no fermentadoras de glucosa. Este estudio permitirá describir la epidemiología de las infecciones y determinar su perfil de resistencia y factores de virulencia, enfocado en la inhibición y erradicación de la biopelícula, para mejorar las estrategias terapéuticas y prevenir la persistencia de estas infecciones en pacientes hospitalizados en un hospital de tercer nivel de México.

4. Hipótesis

Los aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp., presentan alta producción de biopelícula y la presencia de genes asociados a la formación de biopelícula, lo que puede contribuir en la estructura y composición de ésta, y además puede provocar un aumento en la farmacorresistencia.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la producción y composición de biopelícula en aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp., y determinar el efecto de diferentes antibióticos convencionales en la inhibición y erradicación de biopelícula.

5.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar e identificar a nivel especie los aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp.
2. Determinar la producción y composición de biopelícula de los aislamientos clínicos.
3. Detectar la presencia de genes involucrados en la formación de biopelícula de los aislamientos clínicos seleccionados.
4. Determinar el perfil de susceptibilidad en células planctónicas a los antibióticos convencionales de los aislamientos clínicos seleccionados.
5. Detectar la presencia de genes involucrados en la farmacorresistencia de los aislamientos clínicos seleccionados.
6. Determinar el perfil de susceptibilidad en células planctónicas a los antibióticos convencionales de los aislamientos clínicos seleccionados.
7. Evaluar la actividad antimicrobiana de los antibióticos convencionales en la inhibición de biopelícula de los aislamientos clínicos seleccionados.
8. Evaluar la actividad antimicrobiana de los antibióticos convencionales en la erradicación de biopelícula de los aislamientos clínicos seleccionados.

6. Material y métodos

6.1 Sitio de estudio

Las cepas se obtuvieron de un hospital de tercer nivel en México. El Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González es un hospital docente de 1,032 camas ubicado en Monterrey, Nuevo León, que es la tercera ciudad más grande del noreste de México. Este hospital es un complejo de varios edificios de hospitales y la Facultad de Medicina que comprende dos hospitales separados. El edificio principal está designado para el tratamiento de casos no relacionados con COVID-19. Tiene un promedio de 25,000 admisiones y alrededor de 200,000 visitas a la sala de emergencias por año. También recibe referencias de hospitales estatales públicos y privados vecinos. El segundo edificio está designado para el diagnóstico y tratamiento de casos sospechosos o confirmados de COVID-19.

6.2 Declaración ética

Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (número de aprobación GA20-00001). El comité aprobó una solicitud para dispensar el consentimiento escrito de los pacientes porque la información clínica fue anonimizada.

6.3 Selección de aislamientos clínicos e identificación de especies

Se recolectaron aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp. de muestras de fluidos respiratorios y estériles, durante un período de 3 años, de enero de 2018 a diciembre de 2021. Solo se incluyó un aislamiento por paciente. Los aislamientos se identificaron mediante MALDI-TOF MS (sistema Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una colonia de cultivos incubados durante la noche en placas de agar sangre se depositó junto a una placa objetivo de acero inoxidable (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Se agregó 1 µL de ácido fórmico al 70% y, después del secado, se agregó 1 µL de solución matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, Toluca, México). La placa se introdujo en el equipo y se utilizó el software MALDI Biotyper 3.0 para la comparación de los perfiles espectrales con la base de datos. Los aislamientos se

clasificaron según los criterios de identificación de puntuación recomendados por el fabricante, en los que se consideró una puntuación entre 2000 y 2000. Se identificó 2.299 a nivel de género y 2.300 y 3.000 a nivel de especie.

6.3.1 Identificación a nivel especie por secuenciación

El ADN se extrajo mediante lisis térmica a 95°C durante 15 min en cultivos bacterianos de 24 h. El gen *recA* (que codifica la subunidad α de la recombinasa) se seleccionó para la identificación de especies de aislamientos de *Achromobacter* y *Burkholderia*. Los cebadores fueron TCGCAGATCGAAAAGCAGTT y CATGCGGATCTGGTTGATGAAG para *Achromobacter* y TGACCGCCGAGAAGAGCAA y TCTTCTTCGTCCATCGCCTC para *Burkholderia*. La mezcla de PCR de 25 μ L contenía 1 μ L de ADN, 1 μ L de primer forward (25 μ M), 1 μ L de primer reverse (25 μ M), 0.5 mL de dNTP 25 mM, 1.5 μ L de 2 mM MgCl₂, 2.5 μ L 10x PCR-Buffer II, 0.2 μ L de Taq ADN polimerasa (MyTaq, Meridian Bioscience, Estados Unidos) y 17.3 μ L de agua para PCR. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MultiGene OptiMax, Labnet International, Quincy, IL, EE. UU.) con las siguientes condiciones: 10 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94°C, alineamiento durante 45 s a 50°C (*Achromobacter*) o 58°C (*Burkholderia*), extensión durante 60 s a 72°C y extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa teñido con GelRed y se visualizaron utilizando un transiluminador UV. Después de la purificación por precipitación con acetato de sodio 3 M y etanol absoluto a -20° C, los productos se enviaron para secuenciación a gran escala (Macrogen, Corea del Sur). Las secuencias se ensamblaron en el programa BLAST (NCBI) y se enviaron a la base de datos para determinar la identidad genética correcta utilizando cepas de referencia de *Achromobacter* spp. (número de acceso de GenBank JQ746267) y *B. cepacia* (número de acceso de GenBank AF143786).

6.4 Determinación de la producción de biopelícula

Para determinar la formación de biopelícula, se realizó una tinción con cristal violeta con modificaciones menores (Stepanovic et al., 2007). Primero, los aislamientos se cultivaron en agar sangre y se incubaron durante 24 h a 37°C. Se prepararon suspensiones

bacterianas en solución salina a una turbidez de 1.0 en la escala McFarland. Posteriormente, se depositó una dilución 1:100 en 200 µL de caldo tripticasa de soya (TSB, BD Bioxon, Ciudad de México, México) en placas de fondo plano (Corning Inc., Corning, NY, EUA) y se incubó durante 24 h a 37°C. Se eliminó el sobrenadante, se realizaron tres lavados agregando 200 µL de PBS estéril pH 7.3 y se dejaron secar los pocillos. Cada biopelícula se tiñó con 200 µL de violeta cristal al 0.5% (Hycel, Zapopan, México) durante 5 min a temperatura ambiente y se realizaron cinco lavados con 200 µL de PBS estéril. Después, se utilizaron 200 µL de ácido acético al 33% durante 15 min bajo agitación constante. La densidad óptica (DO) se observó a 550 nm en un lector de microplacas (iMark, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EE. UU.). La producción de biopelícula se clasificó según los valores de DO: sin producción de biopelícula, ≥ 0.03 ; producción débil, 0.07–0.10; moderada, 0.15–0.24; y producción fuerte, ≥ 0.25 . *S. maltophilia* ATCC 13637 y *E. coli* ATCC 25922 se utilizaron como controles positivos y negativos de la producción de biopelícula.

6.4.1 Determinación de la composición de 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. De esta dilución se transfirieron 200 µL y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Este procedimiento se realizó por triplicado 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 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 NaIO₄ (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 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 µL de buffer PBS pH:7.2 estéril a cada placa. 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 0.5% a cada uno de los pocillos de las cuatro placas y se dejó incubar durante 5 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 ácido acético al 33% 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.

6.5 Determinación de la presencia de genes asociados a biopelícula

Se investigó la presencia de los genes *smf-1*, *rmlA* y *spgM* asociados a la formación de biopelícula mediante PCR de punto final. A partir de un cultivo joven de 24 h a 37°C, se realizó la extracción de ADN de cada aislamiento mediante la técnica por lisis térmica. Se realizó la mezcla de reacción en un microtubo de poliestireno incluyendo 17.3 μ L de agua ultrapura grado molecular, 1 μ L de cada primer (Tabla 1) 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 MgCl₂ a 2.5 mM, 0.2 μ L Taq ADN polimerasa 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 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 30 s, alineamiento 60°C por 30 s, elongación 72°C por 1 min, y para la extensión final, un ciclo a 72°C por 7 min. Los productos se revelaron mediante una electroforesis convencional con 3 μ L del producto de PCR, 1 μ L de buffer de carga y 1 μ L del revelador GelRed en un gel de agarosa al 1 % sumergido en buffer TBE 0.5 X a 110V durante 1 hora. 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.

Tabla 1. Secuencias de los primers y tamaño de los genes asociados a biopelícula

Gen	Primer	Secuencia (5'- 3')	Temperatura alineamiento	Producto (pb)
<i>smf-1</i>	Forward	GGAAGGTATGTCCGAGTCCG	60°C	674

<i>rmlA</i>	Reverse	GCGGGTACGGCTACGATCAGTT	60°C	82
	Forward	GCAAGGTCATCGACCTGG		
	Reverse	TTGCCGTCGTAGAAGTACAGG		
<i>spgM</i>	Forward	GCTTCATCGAGGGCTACTACC	60°C	80
	Reverse	ATGCACGATCTTGCCGC		

6.6 Determinación de la farmacorresistencia en células planctónicas

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico se determinó utilizando el método de microdilución en caldo, siguiendo el protocolo descrito por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para ello, 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 ceftazidima, meropenem, levofloxacina, TMP-SXT, cloranfenicol y minociclina para las especies de *Burkholderia*; ceftazidima, TMP-SXT y meropenem para las especies de *Achromobacter*; y ceftazidima, levofloxacina, minociclina, TMP-SXT y cloranfenicol para los aislamientos de *Stenotrophomonas*. 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. La concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración de antibiótico en la cual no se aprecia crecimiento a simple vista. La interpretación se realizó de acuerdo con los criterios establecidos por el CLSI para *Burkholderia* y *Stenotrophomonas* spp. y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad A los Antimicrobianos (EUCAST) para *Achromobacter* spp. Se utilizaron como controles de calidad las cepas *S. maltophilia* ATCC 12714, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922.

6.7 Determinación de la presencia de genes asociados a farmacorresistencia

Se investigó la presencia de los genes L1, L2 y *penA* asociados a farmacorresistencia mediante PCR de punto final. A partir de un cultivo joven de 24 h a 37°C, se realizó la extracción de ADN de cada aislamiento mediante la técnica por lisis térmica. Se realizó la mezcla de reacción en un microtubo de poliestireno incluyendo 17.3 µL de agua

ultrapura grado molecular, 1 µL de cada primer (Tabla 2) 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 MgCl₂ a 2.5 mM, 0.2 µL Taq ADN polimerasa a 0.5 U y 1 µL de ADN obteniendo un volumen final de 25 µL. Se llevó a cabo la PCR con las siguientes condiciones: para la desnaturalización inicial un ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 1 min, alineamiento 60°-62°C por 1 min, elongación 72°C por 1 min, y para la extensión final, un ciclo a 72°C por 5 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 % sumergido en buffer TBE 0.5 X a 110V durante 1 hora. 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 para verificar el tamaño del producto.

Tabla 2. Secuencias de los primers y tamaño de los genes asociados a farmacorresistencia.

Gen	Primer	Secuencia (5'- 3')	T alineamiento	Producto (pb)
L1	Forward	ACCATGCGTTCTACCCTGCTCGCCTTCGCC	60	876
	Reverse	TCAGCGGGCCCCGGCCGTTTCCTTGGCCAG		
L2	Forward	CGATTCCTGCAGTTCAGT	60	905
	Reverse	CGGTTACCTCATCCGATC		
<i>penA</i>	Forward	CTTGCGCCGGTCGCCACAAATTC	62	1,162
	Reverse	CTCCGTGAACCTTCCGGAAGCCG		

6.8 Determinación de la farmacorresistencia en células de biopelícula

6.8.1 Actividad de los antibióticos en la inhibición de biopelícula

Para determinar la actividad de los antibióticos en la inhibición de biopelícula, se realizó una tinción con violeta de cristal. Primero, los aislamientos se cultivaron en agar sangre y se incubaron durante 24 h a 37°C. Se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina a una turbidez de 1.0 en la escala McFarland. Posteriormente, se depositó una dilución 1:100 en 200 µL de CST en placas de fondo plano. En *S. maltophilia* se utilizaron ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacino y TMP-SXT. Para *Burkholderia* spp, se agregó a los anteriores minociclina, meropenem. Y en *Achromobacter* spp. solo meropenem, TMP-SXT y ceftazidima, con diferentes concentraciones para determinar la concentración mínima de inhibición de biopelícula (CMIB) de cada antibiótico utilizando el método de microdilución en caldo y se incubó durante 24 h a 37°C. Se eliminó el

sobrenadante, se realizaron tres lavados agregando 200 μ L de PBS estéril pH 7.3 y se dejaron secar los pocillos. Cada biopelícula se tiñó con 200 μ L de violeta cristal al 0.5% durante 5 min a temperatura ambiente y se realizaron cinco lavados con 200 μ L de PBS estéril. Después, se utilizaron 150 μ L de ácido acético al 33%. durante 15 min bajo agitación constante. La CMIB se interpretó por colorimetría de manera cualitativa mediante la tinción con cristal violeta.

6.8.2 Actividad de los antibióticos en la erradicación de biopelícula

La susceptibilidad antimicrobiana en el estado de biopelícula de las cepas se evaluó mediante microdilución en caldo utilizando el dispositivo Calgary de 96 pocillos (Innovotech, AB, Canadá) mediante la determinación de la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB). Un inóculo bacteriano de 1.0 McFarland se diluyó 1:50 en CST, se transfirieron 100 μ L a los pocillos de la placa Calgary y se incubaron durante 24 h a 37°C con agitación constante para promover la formación de biopelícula en las clavijas de la tapa. Las clavijas se lavaron tres veces con PBS estéril (pH 7.3). Luego, la tapa se transfirió a una nueva placa de microtitulación de fondo redondo que contenía las diluciones seriadas de cada antibiótico según el microorganismo (ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacin, TMP-SXT, minociclina, meropenem) en caldo Mueller-Hinton (BD Bioxon). Las biopelículas se expusieron a antibióticos durante 18-24 h para las cepas de *Achromobacter* y 24 h para las de *Burkholderia* y *Stenotrophomonas* según CLSI y EUCAST. Después de este periodo, se retiró la tapa con las biopelículas formadas en las clavijas y se colocó en una nueva placa de microtitulación que contenía caldo Mueller-Hinton estéril fresco. Luego, la biopelícula se disgregó mediante sonicación (limpiador ultrasónico Branson 5800, Electron Microscopy Sciences, EUA) a 40 kHz durante 5 min. La tapa con las clavijas se reemplazó por una tapa estéril convencional y la placa de microtitulación se incubó durante 24 h a 37°C. Se observó la turbidez para determinar la CMEB. Los ensayos se realizaron por triplicado.

6.9 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. La diferencia entre los valores de CMI y CMIB/CMEB se evaluó utilizando la prueba t de Student no pareada, y el nivel de producción de biopelícula entre los géneros se evaluó utilizando la prueba Z aplicando

la corrección de Bonferroni. Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Las pruebas se analizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) versión 6.0 y el software SPSS versión 25.0 (IBM Corporation, NY, EUA).

7. Resultados

7.1 Aislamientos clínicos incluidos en el estudio

En total, se incluyeron en el estudio 133 aislamientos clínicos. Según el análisis de secuenciación *recA*, 24 (18.0 %) eran especies de *Achromobacter* (20 *A. xylooxidans*, 2 *A. marplatensis*, 1 *A. denitrificans* y 1 *A. insolitus*), 12 (9.0 %) eran especies de *Burkholderia* (7 *B. cepacia*, 3 *B. contaminans* y 2 *B. multivorans*). Según el análisis de MALDI-TOF MS, 97 (72.9 %) eran *S. maltophilia*.

Más de la mitad ($n=76$, 57.1 %) de los aislamientos se obtuvieron de muestras respiratorias. Los aislamientos restantes se obtuvieron de sangre ($n=36$, 27.1 %), hueso ($n=10$, 7.5 %) y otras muestras ($n=11$, 8.3 %). La mayoría de los pacientes eran varones ($n=86$, 64.6%) y la edad oscilaba entre 1 mes y 81 años, con una media de 14.8 años. Hasta 34 (25%) pacientes eran de la UCI y 23 (17.2%) de la unidad de COVID-19.

7.2 Producción de biopelícula de los aislamientos clínicos

La producción de biopelícula fue mayor en las cepas de *S. maltophilia*, en las que 85 (87.6%) cepas produjeron biopelícula, 71 (73.2%) de las cuales eran fuertes productoras de biopelícula, 11 (11.3%) eran moderadas y 3 (3.1%) eran débiles productoras de biopelícula ($p < 0.001$, Tabla 3). Cinco (41.6%) aislamientos de *Burkholderia*, fueron fuertes productores de biopelícula, y los aislamientos restantes no produjeron biopelícula en absoluto ($p > 0.05$). De los 24 aislamientos de *Achromobacter*, solo 2 (8.3%) fueron productores de biopelículas (1 débil y 1 fuerte, $p > 0.05$).

Tabla 3. Producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas* spp.

Especies	Producción de biopelícula				Valor P
	Sin producción	Débil	Moderado	Fuerte	
<i>Achromobacter</i> spp. ($n=24$)	22 (91.6)	1 (4.2)	0 (0.0)	1 (4.2)	>0.05
<i>Burkholderia</i> spp. ($n=12$)	7 (58.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (41.6)	>0.05
<i>Stenotrophomonas</i> spp. ($n=97$)	12 (12.4)	3 (3.1)	11 (11.3)	71 (73.2)	<0.001

7.3 Composición de biopelícula de los aislamientos clínicos

La composición de la biopelícula en los aislamientos clínicos de *S. maltophilia*, *Burkholderia* y *Achromobacter* mostró ser heterogénea. Sin embargo, se observó una

tendencia por los carbohidratos, mostrando altos valores de desprendimiento de la biopelícula al ser tratadas enzimáticamente con NaIO_4 , con un promedio de porcentaje de desprendimiento del 81%. Además, los porcentajes de desprendimiento para las carbohidratos, proteínas y ADN extracelular varió entre 51% y > 75%, como se observa en la figura 1. La estructura de la biopelícula se relaciona en el grado de desprendimiento, de modo que una mayor tasa de desprendimiento sugiere una mayor presencia en la matriz extracelular.

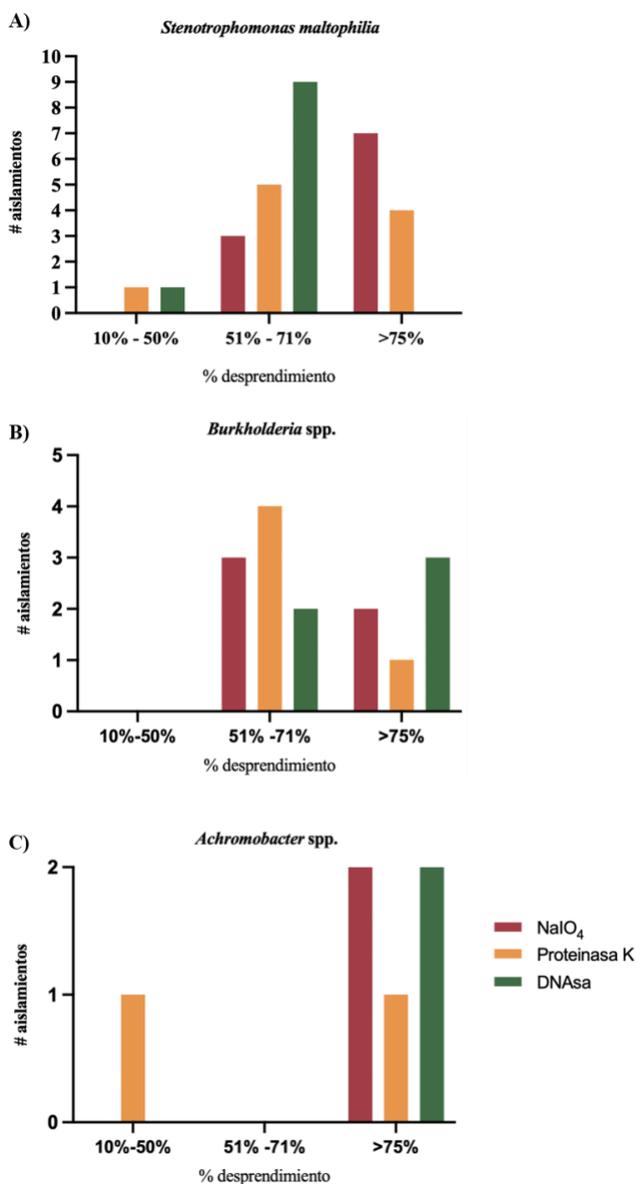


Figura 1. Composición de la biopelícula de aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia spp.* y *Achromobacter spp.* El porcentaje de desprendimiento de cada componente se calculó mediante la comparación entre las condiciones de control y tratamiento, empleando proteínasa K para la

degradación de proteínas, metaperyodato de sodio para la eliminación de carbohidratos y DNasa I para ADN.

7.4 Presencia de genes asociados a la formación de la biopelícula

Se determinó la presencia de los genes *rmlA*, *spgM* y *smf-1* asociados a la formación de biopelícula y L2, una β -lactamasa asociada con la resistencia a ceftazidima. Se detectó la frecuencia de estos genes fue del 60%, 87.05% y 76.47%, respectivamente (Tabla 4). Se confirmó la presencia de estos genes entre todos los aislamientos de *S. maltophilia* productores de biopelícula fuertes, moderados y débiles.

Tabla 4. Genes asociados a la producción de biopelícula de *Stenotrophomonas* spp.

Presencia/ausencia	Genes asociados a biopelícula			Formación de biopelícula
	% (n)			
	<i>smf-1</i>	<i>rmlA</i>	<i>spgM</i>	
Presencia	76.47 (65)	60.0 (51)	87.05 (74)	76.62% (85/97)
Ausencia	23.25 (20)	40.0 (34)	12.94 (11)	

7.5 Farmacorresistencia de los aislamientos clínicos en células planctónicas

En las especies de *Achromobacter*, se detectó resistencia moderada a TMP-SXT (62.5%) y alta susceptibilidad a ceftazidima (100%) y meropenem (100%). En las especies de *Burkholderia*, se detectó resistencia moderada a TMP-SXT (50.0%) y baja resistencia a ceftazidima (8.3%), meropenem (8.3%) y levofloxacino (8.3%). No se detectó resistencia a minociclina (0.0%) ni a cloranfenicol (0.0%). En *S. maltophilia*, se detectó resistencia moderada a ceftazidima (57.7 %) y TMP-SXT (52.6 %) y baja resistencia al cloranfenicol (3.1 %). No se detectó resistencia a minociclina (0.0 %) ni a levofloxacino (0.0 %) (Tabla 5).

Tabla 5. Perfiles de farmacorresistencia de los aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Especie	Fármaco	CMI (µg/mL)			S n (%)	I n (%)	R n (%)
		Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀			
<i>Achromobacter</i> spp. n = 24	Ceftazidima	4–16	4	8	24 (100)	NA	0 (0.0)
	Meropenem	0.25–0.5	0.25	0.5	24 (100)	NA	0 (0.0)
	TMP-SXT	0.125/2.75 –4/76	0.25/4.75	1/19	9 (37.5)	NA	15 (62.5)
<i>Burkholderia</i> spp. n = 12	Ceftazidima	2–32	8	16	8 (66.7)	3 (25.0)	1 (8.3)
	Meropenem	1–32	2	4	11 (91.7)	0 (0.0)	1 (8.3)
	Minociclina	1–4	2	2	12 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Levofloxacino	1–8	2	2	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)
	TMP-SXT	2/38–4/76	2/38	4/76	6 (50.0)	NA	6 (50.0)
	Cloranfenicol	4–16	8	16	9 (75.0)	3 (25.0)	0 (0.0)
<i>S. maltophilia</i> n = 97	Ceftazidima	1–128	32	128	31 (32.0)	10 (10.3)	56 (57.7)
	Minociclina	1–4	1	1	97 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Levofloxacino	0.5–8	0.5	2	97 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
	TMP-SXT	0.25/4.75 –16/304	4/76	16/304	46 (47.4)	NA	51 (52.6)
	Cloranfenicol	2–64	8	16	80 (82.5)	14 (14.4)	3 (3.1)

CMI, concentración mínima inhibitoria; CMI₅₀ y CMI₉₀ se refieren a la CMI requerida para inhibir el crecimiento del 50% y 90% de las cepas, respectivamente. R, resistente; S, susceptible; I, intermedio; TMP-SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; NA: no aplica.

7.6 Presencia de genes asociados a farmacorresistencia

Se determinó la presencia del gen *penA* y L2, genes que codifican una β-lactamasa de clase A y una cefalosporinasa, respectivamente, asociado a la resistencia a ceftazidima. Se encontró la presencia del gen *penA* en el 8.3% de los aislamientos y L2 en 68.04%. De estos, solamente 4 aislamientos fueron resistentes a ceftazidima en especies de *Burkholderia* y 38 en aislamientos de *S. maltophilia*, presentando solamente 1 de 12 aislamientos de *Burkholderia* y 47 de 66 la presencia de estos genes, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Genes asociados a resistencia a ceftazidima de *Stenotrophomonas* spp y *Burkholderia* spp .

Presencia/ausencia	Aislamientos resistentes a ceftazidima	
	% (n)	
	L2	<i>penA</i>
Presencia	71.2 (47/66)	8.3 (1/12)
Ausencia	28.8 (19/66)	91.6 (11/12)

7.7 Actividad de los antibióticos en la inhibición de biopelícula

Se utilizaron 6 antibióticos para determinar los valores de CMIB bacteriana en cepas productoras de biopelícula seleccionadas de los tres géneros.

7.7.1 *Achromobacter* spp.

De los dos aislamientos productores de biopelícula de *A. xylooxidans*, el valor CMIB superó 512 µg/mL de TMP-SXT y >1,024 µg/mL de ceftazidima. Solo meropenem demostró actividad inhibitoria <1 µg/mL (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de inhibición de biopelícula de aislamientos clínicos de *Achromobacter* spp.

Especies	ID	Producción de biopelícula	Ceftazidima µg/mL		TMP-SXT µg/mL		Meropenem µg/mL	
			CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB
<i>A. xylooxidans</i>	18-2259	Fuerte	4	> 1,024	0.125/2.75	512/9,728	0.25	0.25
<i>A. xylooxidans</i>	18-3488	Débil	4	> 1,024	0.25/4.75	512/9,728	0.25	0.25

CMIB: concentración mínima de inhibición de biopelícula; CMI: concentración mínima inhibitoria; ND: no determinado; TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

7.7.2 *Burkholderia* spp.

En aislamientos de *Burkholderia*, los valores de CMIB demostraron un rango entre 8-128 µg/mL, clasificados como resistentes. Solo la minociclina logró tener un efecto inhibitorio menor a 2 µg/mL en los aislamientos seleccionados (Tabla 8).

7.7.3 *Stenotrophomonas* spp.

Los valores de CMIB de los aislamientos de *S. maltophilia* mostraron concentraciones superiores a 8 µg/mL, 32 µg/mL y 16 µg/mL para ceftazidima, cloranfenicol y TMP-SXT, respectivamente. Sólo mostró actividad inhibitoria solamente el antibiótico levofloxacin en concentraciones menores a 4 µg/mL (Tabla 9).

Tabla 8. Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de inhibición de biopelícula de aislamientos clínicos de *Burkholderia* spp.

Especies	ID	Producción de biopelícula	Ceftazidima µg/mL		TMP-SXT µg/mL		Meropenem µg/mL		Cloranfenicol 1 µg/mL		Levofloxacin µg/mL		Minociclina µg/mL	
			CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB
<i>B. cepacia</i>	18-3041	Fuerte	16	128	2/38	64	2	16	8	128	2	64	2	1
<i>B. cepacia</i>	18-3492	Fuerte	8	128	4/76	16	2	8	8	64	1	128	2	1
<i>B. cepacia</i>	19-1535	Fuerte	32	128	4/76	64	4	8	16	128	8	32	4	2
<i>B. cepacia</i>	21-0640	Fuerte	8	128	4/76	32	1	64	16	128	2	16	1	2
<i>B. contaminans</i>	19-1534	Fuerte	4	128	2/38	32	2	16	4	64	2	64	2	2

CMIB: concentración mínima de inhibición de biopelícula; CMI: concentración mínima inhibitoria; ND: no determinado; TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

Tabla 9. Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de inhibición de biopelícula de aislamientos clínicos *Stenotrophomonas*.

Especies	ID	Producción de biopelícula	Ceftazidima µg/mL		Cloranfenicol µg/mL		Levofloxacin µg/mL		TMP-SXT µg/mL	
			CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB
<i>S. maltophilia</i>	20-0084	Fuerte	64	128	16	128	4	4	4/76	16/304
<i>S. maltophilia</i>	20-0655	Fuerte	64	64	8	64	2	4	8/152	64/1,216
<i>S. maltophilia</i>	20-0660	Fuerte	128	32	16	64	1	4	16/304	8/152
<i>S. maltophilia</i>	21-0097	Fuerte	128	256	8	128	1	2	8/152	8/152
<i>S. maltophilia</i>	21-0616	Fuerte	64	64	32	32	2	4	8/152	16/304
<i>S. maltophilia</i>	21-0618	Fuerte	64	64	32	64	8	4	8/152	128/2,432
<i>S. maltophilia</i>	21-0888	Fuerte	128	32	16	32	0.5	2	16/304	16/304
<i>S. maltophilia</i>	21-0921	Fuerte	128	8	8	32	0.5	2	4/76	16/304
<i>S. maltophilia</i>	21-0959	Fuerte	32	8	8	128	0.5	2	8/152	32/608
<i>S. maltophilia</i>	21-1018	Fuerte	128	256	4	64	1	2	16/304	16/304

CMIB: concentración mínima de inhibición de biopelícula; CMI: concentración mínima inhibitoria; ND: no determinado; TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

7.8 Actividad de los antibióticos en la erradicación de biopelícula

Se evaluó la susceptibilidad de biopelícula bacteriana madura a varios antibióticos en cepas productoras de biopelícula seleccionadas de los tres géneros. No se detectaron diferencias significativas entre los valores de CMEB y de CMI (Tabla 10).

7.8.1 *Achromobacter* spp.

De las dos cepas productoras de biopelícula de *A. xylosoxidans*, el valor de CMEB para TMP-SXT (512/9,728 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.0001$) fue mayor que los valores de CMI. En las células planctónicas se obtuvo valores por debajo de 8/152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aun considerados como resistentes (Fig. 2). En cambio, los valores CMEB y CMI para ceftazidima y meropenem no mostraron diferencias.

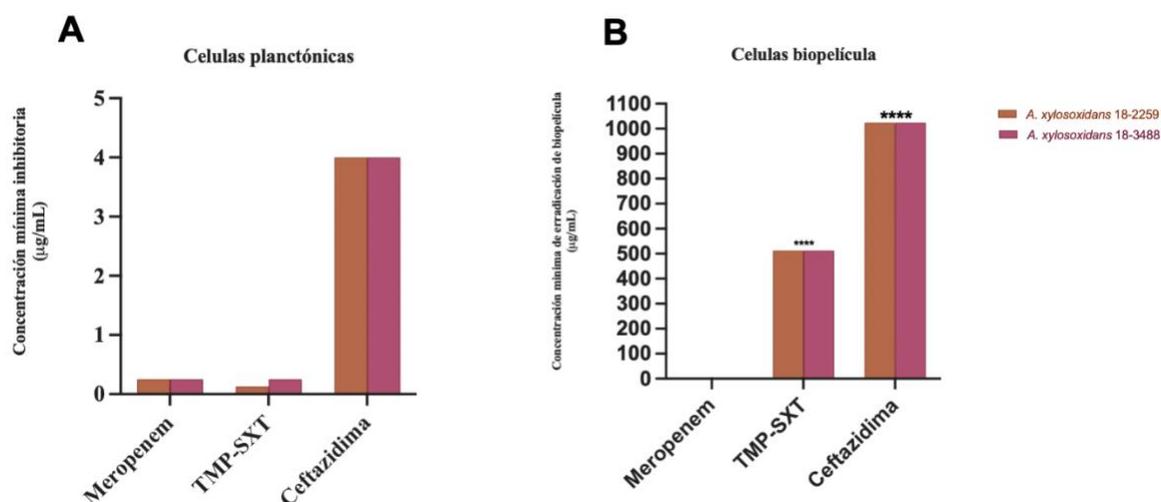


Figura 2. Actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de especies de *Achromobacter*. La CMI en células planctónicas (A) se comparó con la CMEB en células de biopelícula (B) para ceftazidim, meropenem y TMP-SXT en dos cepas productoras de biopelícula de *A. xylosoxidans*, **** $p < 0.0001$ en la prueba t de Student. CMEB, concentración mínima de erradicación de biofilm; CMI, concentración mínima inhibitoria; TMP-SXT, trimetoprima-sulfametoxazol.

7.8.2 *Burkholderia* spp.

En cepas de *Burkholderia* productoras de biopelículas ($n=5$), los valores CMEB fueron significativamente diferentes de los valores CMI para ceftazidim ($>1,024 \mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.0001$), cloranfenicol ($>128 \mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.0001$), levofloxacino ($>256 \mu\text{g}/\text{mL}$, $p = 0.0106$) y TMP-SXT (512/9,728 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p = 0.0102$), como se muestra en la Fig. 3. En

cambio, los valores CMEB y CMI para minociclina y meropenem no mostraron diferencias.

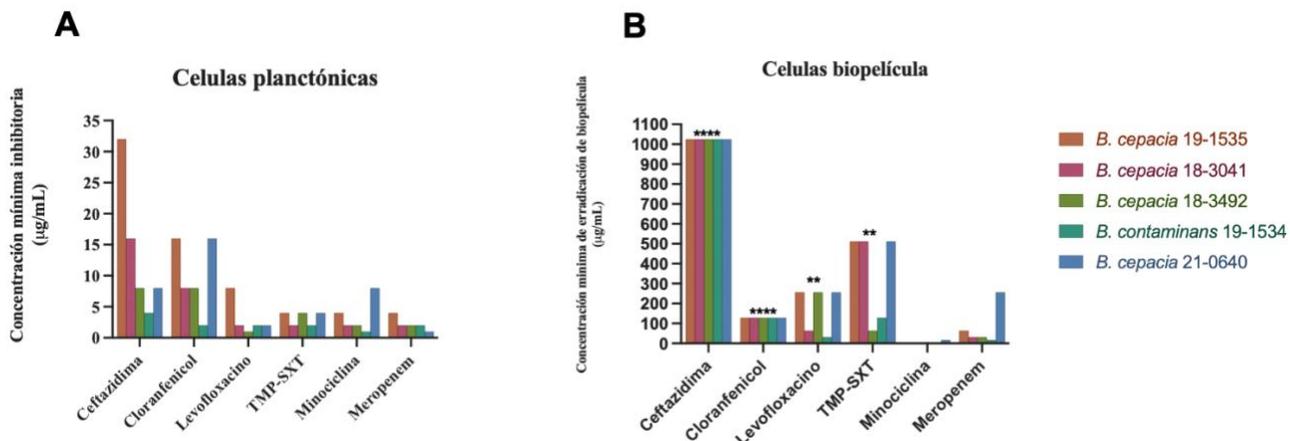


Figura 3. Actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de especies de *Burkholderia*. La CMI en células planctónicas (A) se comparó con la CMEB en células de biopelícula (B) de ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacin, meropenem, minociclina y TMP-SXT en cinco cepas productoras de biopelícula de *Burkholderia*, ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ en la prueba t de Student.

7.8.3 *Stenotrophomonas* spp.

Asimismo, los valores de CMEB para las cepas de *S. maltophilia* ($n = 10$) fueron significativamente más altos que los valores de CMI para ceftazidima ($>1.024 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$), cloranfenicol ($>128 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$) y TMP-SXT ($128/2.432 \mu\text{g/mL}$, $p = 0.0356$). No se detectaron diferencias entre los valores de CMEB y CMI para levofloxacin (Fig. 4).

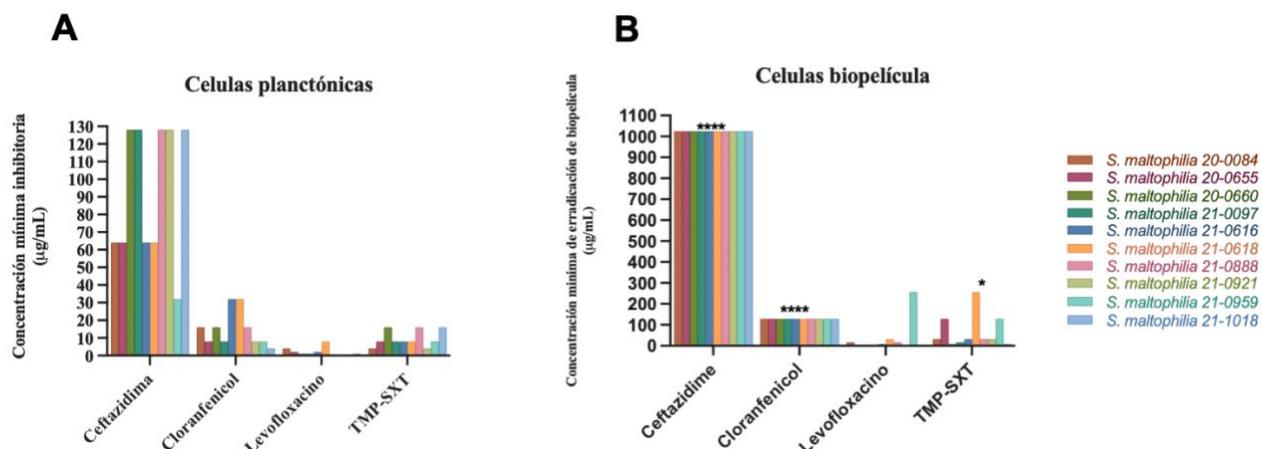


Figura 4. Actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de *Stenotrophomonas maltophilia*. La CMI en células planctónicas (A) se comparó con la CMEB en células

de biopelícula (**B**) de ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacino y TMP-SXT en 10 cepas productoras de biopelícula de *S. maltophilia*, *p< 0.05 y ****p< 0.0001 en la prueba t de Student.

Tabla 10. Comparación de los perfiles de resistencia a fármacos en células bacterianas planctónicas y de biopelícula de aislamientos clínicos de *Achromobacter*, *Burkholderia* y *Stenotrophomonas*.

Especies	ID	Producción de biopelícula	Ceftazidima µg/mL		Cloranfenicol µg/mL		Levofloxacino µg/mL		Meropenem µg/mL		Minociclina µg/mL		TMP-SXT µg/mL	
			CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI	CMEB	CMI	CMEB
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	18-2259	Fuerte	4	> 1,024	ND	ND	ND	ND	0.25	0.25	ND	ND	0.125/2.75	512/9,728
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	18-3488	Débil	4	> 1,024	ND	ND	ND	ND	0.25	0.25	ND	ND	0.25/4.75	512/9,728
<i>Burkholderia cepacia</i>	18-3041	Fuerte	16	> 1,024	8	> 128	2	64	2	32	2	2	2/38	512/9,728
<i>Burkholderia cepacia</i>	18-3492	Fuerte	8	> 1,024	8	128	1	256	2	32	2	2	4/76	64/1,216
<i>Burkholderia cepacia</i>	19-1535	Fuerte	32	> 1,024	16	> 128	8	> 256	4	64	4	2	4/76	512/9,728
<i>Burkholderia cepacia</i>	21-0640	Fuerte	8	> 1,024	16	>128	2	> 256	1	256	1	16	4/76	512/9,728
<i>Burkholderia contaminans</i>	19-1534	Fuerte	4	> 1,024	4	128	2	32	2	16	2	2	2/38	128/2,432
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20-0084	Fuerte	64	> 1,024	16	> 128	4	16	ND	ND	<1	ND	4/76	32/608
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20-0655	Fuerte	64	> 1,024	8	> 128	2	4	ND	ND	<1	ND	8/152	128/2,432
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20-0660	Fuerte	128	> 1,024	16	> 128	1	1	ND	ND	<1	ND	16/304	8/152
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-0097	Fuerte	128	> 1,024	8	> 128	1	2	ND	ND	<1	ND	8/152	16/304
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-0616	Fuerte	64	> 1,024	32	> 128	2	8	ND	ND	<1	ND	8/152	32/608
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-0618	Fuerte	64	> 1,024	32	> 128	8	32	ND	ND	<1	ND	8/152	256/9,728
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-0888	Fuerte	128	> 1,024	16	> 128	0.5	16	ND	ND	<1	ND	16/304	32/608
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-0921	Fuerte	128	> 1,024	8	> 128	0.5	4	ND	ND	<1	ND	4/76	32/608
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-0959	Fuerte	32	> 1,024	8	> 128	0.5	> 256	ND	ND	<1	ND	8/152	128/2,432
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21-1018	Fuerte	128	> 1,024	4	> 128	1	1	ND	ND	<1	ND	16/304	8/152

CMEB: concentración mínima de erradicación de biopelícula; CMI: concentración mínima inhibitoria; ND: no determinado; TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

8. Discusión

En los últimos años, la aplicación de la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) y el uso de bases de datos comerciales como Bruker Biotyper y VITEK MS han sido objeto de estudios y validaciones en el ámbito de la microbiología. Strejcek et al. llevaron a cabo una comparación entre MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper) y la secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación de microorganismos en suelos (Strejcek, Smrhova, Junkova, & Uhlik, 2018). Los resultados mostraron una concordancia del 92% a nivel de género, mientras que, a nivel de especie, solo el 35% de los aislamientos coincidió con la identificación obtenida mediante el análisis genético. Por otro lado, se ha reportado la utilización de MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper) y la secuenciación del gen 16S rRNA en aislamientos anaerobios obtenidos de hemocultivos en un hospital universitario noruego, con el objetivo de evaluar la confiabilidad de la identificación por MALDI-TOF MS en comparación con la secuenciación de ARNr 16S, demostrando un rendimiento alto de la espectrometría de masas MALDI-TOF en cuanto a la identificación a nivel de género. En cuanto a la identificación a nivel de especie, la espectrometría de masas MALDI-TOF tuvo un rendimiento satisfactorio para todas las especies de *Clostridium*, *Prevotella* y *Fusobacterium*. Lo mismo se aplicó a las especies de *Bacteroides*, con la excepción de que no pudo diferenciar entre los pares *B. faecis*/*B. thetaiotaomicron*, entre otros, debido a la inexistencia de espectros de referencia para estos microorganismos (Handal, Bakken Jorgensen, Smith Tunsjo, Johnsen, & Leegaard, 2015). En nuestro estudio, ya que los aislamientos de *Achromobacter* spp. y *Burkholderia* spp. se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, resultando en una identificación confiable para género, se analizaron mediante la secuenciación *recA*, para reducir la variabilidad en la eficacia del método dependiendo del origen y complejidad de las muestras analizadas relacionadas a infecciones.

Los bacilos gramnegativos representan una causa frecuente de infecciones adquiridas en la comunidad como en entornos hospitalarios, además de estar implicados en infecciones oportunistas. En los últimos años, se ha observado un crecimiento significativo en la formación de biopelículas, lo que ha contribuido de manera conjunta a

la propagación de bacilos gramnegativos resistentes a diversos tratamientos antimicrobianos (Oliveira & Reygaert, 2020).

Esta mayor resistencia se atribuye a la estructura tridimensional y a la matriz extracelular que caracteriza a la biopelícula, las cuales dificultan la penetración y acción de los agentes antimicrobianos. Además, se ha identificado que factores como la disminución de la actividad metabólica en las capas internas y la expresión de genes asociados a mecanismos de resistencia contribuyen a este fenómeno. Estos resultados resaltan la relevancia clínica de considerar la formación de biopelículas al seleccionar estrategias terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por *S. maltophilia*, *Burkholderia* spp. y *Achromobacter* spp (Castaneda et al., 2016; Ciofu et al., 2017).

La formación de biopelículas en bacterias Gram negativas no fermentadoras puede ayudar a aumentar la colonización y el desarrollo de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos o en estado crítico. Estos microorganismos sobreviven durante periodos prolongados y causan infecciones del tracto respiratorio, bacteriemia y meningitis, entre otras (I. J. Abbott & Peleg, 2015; Chawla, Vishwanath, & Munim, 2013; X.-M. Kang, Wang, Zhang, Zhang, & Qian, 2015). En nuestro estudio, la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de muestras respiratorias y de sangre. La formación de biopelículas bacterianas puede contribuir a la patogénesis de enfermedades, ya que aumenta la resistencia de las bacterias a los tratamientos antimicrobianos (Vestby, Gronseth, Simm, & Nesse, 2020). Los datos previos sobre la formación de biopelículas de estos microorganismos en México son limitados. En aislamientos clínicos de México, la capacidad de estos microorganismos para formar biopelículas se presenta con un porcentaje mayor en aislamientos de *Stenotrophomonas*, que puede ser mayor al 90% (Elufisan et al., 2020). En concordancia con nuestros resultados, persiste una alta producción de biopelículas en aislamientos de *Stenotrophomonas*, ya que el 87.6% de las cepas de *S. maltophilia* de nuestro estudio fueron productores de biopelícula. En cambio, en nuestro estudio se detectaron porcentajes bajos de producción de biofilm en *Achromobacter* (8.3%) y moderados en especies de *Burkholderia* (41.6%). Nuestros resultados difieren de un estudio previo en el que se informó que la producción de biopelícula en aislamientos de *Achromobacter* obtenidos de pacientes con infecciones crónicas y ocasionales del tracto respiratorio fue del 75.7%. La mayoría de los

aislamientos mostraron una producción baja-moderada de biopelícula, lo que confirma la baja capacidad de adhesión de *Achromobacter* spp. en superficies (Sandri et al., 2022). Sin embargo, a diferencia de ese estudio, no pudimos distinguir entre cepas de infecciones crónicas o agudas; la gran mayoría de cepas incapaces de formar biopelícula se aislaron de infecciones crónicas, lo que sugiere un mecanismo de adaptación dentro del huésped en el pulmón con fibrosis quística.

Aunque no se observó ninguna diferencia significativa en la producción de biopelícula entre los aislamientos crónicos y ocasionales, ni entre los aislamientos crónicos tempranos y tardíos, la gran mayoría de las cepas incapaces de formar biopelícula se aislaron de la infección crónica. Esto podría sugerir un mecanismo de adaptación dentro del huésped en el pulmón con fibrosis quística debido a los diferentes regímenes de tratamiento antibiótico utilizados. Los aislamientos de *Achromobacter* spp. de la infección pulmonar crónica y ocasional muestran diferentes características de virulencia y resistencia a los antibióticos, algunas de las cuales podrían estar relacionadas con la persistencia en los pulmones con fibrosis quística (Flores-Trevino et al., 2019).

Otro estudio mostró un 53% de producción de biopelícula en cepas de *Burkholderia* de pacientes con y sin fibrosis quística, y ambos mostraron una producción de biopelícula similar (Akisoglu et al., 2019). La formación de biopelícula entre las especies identificadas en el estudio se determinó como 53% ($n = 20$). No hubo diferencia estadística cuando se evaluó por separado la producción de biopelículas entre las especies de *Burkholderia* y las tasas de producción de biopelículas entre los aislamientos de *Burkholderia* con fibrosis quística (56%, 14/25) y sin fibrosis quística (46%, 6/13) ($p > 0.05$).

En nuestro estudio, las tasas de resistencia a los antibióticos en cepas de *S. maltophilia* fueron moderadas (>50%) a ceftazidima y TMP-SXT, y bajas (<5%) a cloranfenicol, minociclina y levofloxacino. Estos datos, además de estudios previos de México, muestran que las tasas de resistencia a TMP-SXT están aumentando con el paso de los años. Estos resultados podrían sugerir que, en nuestra población, TMP-SXT debería usarse menos para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* y podría usarse cloranfenicol, minociclina y levofloxacino en su lugar (Flores-Trevino et al., 2014; Herrera-Heredia et al., 2017).

La susceptibilidad a los antibióticos varía entre las células productoras de biopelícula y las células planctónicas. Las concentraciones de antibióticos necesarias para erradicar las infecciones asociadas a la biopelícula no se pueden evaluar mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana estándar. Se utilizó el dispositivo Biofilm Calgary para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos en las células de la biopelícula después de la sonicación, en lugar de las células planctónicas, como se realiza de manera rutinaria. La frecuencia y el tiempo utilizados para la sonicación se utilizaron como se informó anteriormente (Ceri et al., 1999). Asimismo, se estudió previamente el efecto potencial del tratamiento de sonicación en las células de la biopelícula. Se obtuvieron células viables de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* después de la disrupción de la biopelícula mediante sonicación (Chen, Thomsen, Winkler, & Xu, 2020). Además, la susceptibilidad antimicrobiana en las células planctónicas según el método CLSI fueron similares a las obtenidas en las células de la biopelícula utilizando el dispositivo Calgary (Ceri et al., 1999).

Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de la biopelícula bacteriana madura a varios antibióticos en cepas seleccionadas productoras de biopelículas de los tres géneros. Nuestros resultados mostraron que la resistencia a ceftazidima, cloranfenicol y TMP-SXT en cepas de *S. maltophilia* aumentó debido a la producción de biopelícula, ya que la CMEB de las células de la biopelícula fueron más altas que las CMI de las células planctónicas. Además, no se detectaron diferencias entre los valores de CMEB y CMI para levofloxacino, lo que difiere de otros estudios, en los que los aislados susceptibles a levofloxacino según sus CMI fueron resistentes en células de biopelícula. En conjunto, estos resultados sugieren que ni ceftazidima, cloranfenicol ni TMP-SXT pueden usarse en monoterapia para la erradicación de biopelículas y solo levofloxacino debe usarse para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* asociadas a biopelículas en nuestra población (Pompilio et al., 2020; Wang, Wang, Kudinha, Xiao, & Zhuo, 2016).

Un estudio previo de especies de *Burkholderia* informó tasas bajas de resistencia a levofloxacino (18%), TMP-SXT (13%) y meropenem (6%), y alta resistencia a ceftazidima (72%). En nuestro estudio, se detectó resistencia moderada a TMP-SXT (50.0%) y baja resistencia (<10%) a ceftazidima, meropenem, levofloxacino, minociclina y cloranfenicol en especies de *Burkholderia*. Estos resultados podrían sugerir que, en

nuestra población, casi todos los antibióticos podrían usarse para el tratamiento de infecciones por *Burkholderia*. Sin embargo, previamente se reportaron altos niveles de valores de CMEB de ceftazidima, doxiciclina e imipenem en células de biofilm. Asimismo, en nuestro estudio los valores de CMEB fueron más altos que los valores de CMI para ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacino y TMP-SXT, lo que sugiere que ninguno de estos fármacos debería usarse en monoterapia para el tratamiento de infecciones por *Burkholderia* asociadas a biopelícula en nuestra población. No se detectaron diferencias entre los valores de CMEB y CMI para minociclina y meropenem, lo que indica el uso potencial de estos fármacos contra infecciones por *Burkholderia* asociadas a biopelícula.

En cuanto a *Achromobacter*, un estudio epidemiológico informó tasas de resistencia superiores al 50% para ceftazidima, meropenem y TMP-SXT en cepas de *A. xylosoxidans* de pacientes con fibrosis quística (Okoliegbe, Hijazi, Cooper, Ironside, & Gould, 2020). En nuestro estudio detectamos una alta resistencia a TMP-SXT (62.5%) y no se detectó resistencia a ceftazidima y meropenem en células planctónicas, aunque los valores de CMEB en células de biopelícula tanto para TMP-SXT como para ceftazidima fueron superiores a los valores de CMI. La concentración de antimicrobianos necesaria para erradicar por completo la biopelícula madura puede ser hasta 1,000 veces superior en comparación con las células planctónicas. Sin embargo, como los valores de CMEB y CMI para meropenem no mostraron diferencias, meropenem podría utilizarse para el tratamiento de infecciones por *Achromobacter* asociadas a biopelícula en nuestra población. El mecanismo de acción de cada fármaco antimicrobiano también podría influir en las diferencias entre las CMEB observadas en las células de biopelícula y la CMI observada en las células planctónicas. Los fármacos bactericidas, como la ceftazidima, la levofloxacina y el meropenem, tienen como objetivo la pared celular bacteriana. Los fármacos bacteriostáticos, como el cloranfenicol, la minociclina y el TMP-SXT, tienen como objetivo la síntesis de proteínas bacterianas. Según nuestros resultados, los antibióticos bactericidas pudieron erradicar la biopelícula madura, como la levofloxacina en *S. maltophilia* y el meropenem en *Achromobacter* y en *Burkholderia*. Sin embargo, la erradicación exitosa de la biopelícula por estos antibióticos podría depender en gran

medida de la composición de los EPS (por ejemplo, polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), ya que puede variar entre especies (Flores-Trevino et al., 2019).

Además, es importante señalar la manera en que se establece y mantiene la patogénesis estos microorganismos a través de la colonización, adhesión celular y formación de biopelícula, donde diversos genes tienen un papel relacionado con la biopelícula (Di Bonaventura et al., 2004). Ejemplo de esto son los genes relacionados con los polisacáridos *rmlA*, *rmlC*, *xanB* y *spgM* involucrados en la formación de biopelícula (T.-P. Huang, Somers, & Wong, 2006; McKay, Woods, MacDonald, Poole, & immunity, 2003). Estudios confirman que algunos genes como SMF-1 son importantes para la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas en varios sistemas, tanto bióticos como abióticos (Bhaumik et al., 2025). El gen *rmlA* se detectó en el 98% de los aislamientos analizados por (Azimi, Aslanimehr, Yaseri, Shadkam, & Douraghi, 2020), lo cual concuerda con nuestros resultados de estos genes presentes en los aislamientos de *S. maltophilia* productores de biopelícula fuertes, moderados y débiles.

Nuestros hallazgos muestran que, además de producir una biopelícula fuerte, la resistencia a los medicamentos aumentó debido a la producción de biopelícula para algunos antibióticos en los aislamientos de *Stenotrophomonas* y *Burkholderia*. Por lo tanto, los enfoques de pruebas clínicas modernas deberían incluir la producción de biopelículas en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, para contribuir a una prueba de susceptibilidad a las biopelículas estandarizada (Thieme et al., 2019).

9. Conclusiones

- Mas del 85% de los aislamientos clínicos se relacionó con infecciones a nivel respiratorio; el microorganismo más frecuentemente relacionado fue *S. maltophilia*.
- La producción de biopelícula fue mayor en las cepas de *S. maltophilia* (87.6%) comparado con la producción de biopelícula en *Burkholderia* (41.6%) y *Achromobacter* (8.3%).
- En células de biopelícula de aislamientos de *Achromobacter*, se detectó resistencia moderada a TMP-SXT (62.5%) y alta susceptibilidad a ceftazidima (100%) y meropenem (100%). La resistencia a ceftazidima y TMP-SXT aumentó debido a la producción de biopelícula, ya que la CMEB fue mayor que la CMI, pero no así para meropenem. Esto sugiere que minociclina y meropenem pueden usarse en monoterapia para el tratamiento de infecciones por *Achromobacter* asociadas a biopelícula en nuestra población.
- En células de biopelícula de aislamientos de *Burkholderia*, se detectó resistencia moderada a TMP-SXT (50.0%) y baja resistencia a ceftazidima (8.3%), meropenem (8.3%) y levofloxacino (8.3%). No se detectó resistencia a minociclina (0.0%) ni a cloranfenicol (0.0%). La resistencia a ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacino y TMP-SXT aumentó debido a la producción de biopelícula, ya que la CMEB fue mayor que la CMI, pero no así para minociclina y meropenem. Esto sugiere que minociclina y meropenem pueden usarse en monoterapia para el tratamiento de infecciones por *Burkholderia* asociadas a biopelículas en nuestra población.
- En células planctónicas de *S. maltophilia*, se detectó resistencia moderada a ceftazidima (57.7 %) y TMP-SXT (52.6 %) y baja resistencia al cloranfenicol (3.1%). No se detectó resistencia a minociclina (0.0 %) ni a levofloxacino (0.0 %). La resistencia a ceftazidima, cloranfenicol y TMP-SXT aumentó debido a la producción de biopelícula, ya que la CMEB fue más alta que la CMI, pero no así para levofloxacino. Esto sugiere solo levofloxacino puede usarse en monoterapia para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* asociadas a biopelículas en nuestra población.

- La resistencia en los aislamientos clínicos aumentó debido a la producción de biopelícula, en particular a ceftazidima y trimetoprim-sulfametoxazol para *Achromobacter*, *Burkholderia*, y *Stenotrophomonas*; cloranfenicol y levofloxacino en *Burkholderia*; y cloranfenicol en *S. maltophilia*. Los antibióticos que pudieron erradicar la biopelícula fueron levofloxacina en *S. maltophilia*, minociclina y meropenem en *Burkholderia*, y meropenem en *Achromobacter*.

10. Referencias

- Abbott, F. K., Milne, K. E., Stead, D. A., & Gould, I. M. (2016). Combination antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex: significance of species. *Int J Antimicrob Agents*, 48(5), 521-527. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.07.020
- Abbott, I. J., & Peleg, A. Y. (2015). *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin Respir Crit Care Med*, 36(1), 99-110. doi:10.1055/s-0034-1396929
- Akisoglu, O., Engin, D., Saricam, S., Mustak, H. K., Sener, B., & Hascelik, G. (2019). [Multilocus sequence analysis, biofilm production, antibiotic susceptibility and synergy tests of *Burkholderia* species in patients with and without cystic fibrosis]. *Mikrobiyol Bul*, 53(1), 22-36. doi:10.5578/mb.67730
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Appl Environ Microbiol*, 83(3). doi:10.1128/AEM.02508-16
- Almuzara, M, Limansky, A, Ballerini, V, Galanternik, L, Famiglietti, A & Vay, C 2010. In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *International journal of antimicrobial agents*, 35: 68-71.
- Antony, B, Cherian, EV, Bloor, R & Shenoy, KV 2016. A sporadic outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteremia in pediatric intensive care unit of a tertiary care hospital in coastal Karnataka, South India. *Indian J Pathol Microbiol*, 59: 197-9.

- Azimi, A., Aslanimehr, M., Yaseri, M., Shadkam, M., & Douraghi, M. J. J. o. G. A. R. (2020). Distribution of *smf-1*, *rmlA*, *spgM* and *rpfF* genes among *Stenotrophomonas maltophilia* isolates in relation to biofilm-forming capacity. 23, 321-326.
- Bador, J, Amoureux, L, Blanc, E & Neuwirth, C 2013. Innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to *AxyXY-OprZ*, an RND-type multidrug efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57: 603-605.
- Bador, J, Amoureux, L, Duez, J-M, Drabowicz, A, Siebor, E, Llanes, C & Neuwirth, C 2011. First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, *AxyABM*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55: 4912-4914.
- Bhaumik, R., Beard, A., Harrigan, O., Ramos-Hegazy, L., Marrs, J., Anderson, G. G., & Mattoo, S. J. B. (2025). Role of SMF-1 and Cbl pili in *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation. 100253.
- Bostanghadiri, N, Ghalavand, Z, Fallah, F, Yadegar, A, Ardebili, A, Tarashi, S, Pournajaf, A, Mardaneh, J, Shams, S & Hashemi, A 2019. Characterization of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated From Selected Hospitals in Iran. *Front Microbiol*, 10: 1191.
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 25(1), 2-41. doi:10.1128/CMR.00019-11
- Brown, H. L., Reuter, M., Hanman, K., Betts, R. P., & van Vliet, A. H. (2015). Prevention of biofilm formation and removal of existing biofilms by extracellular DNases of *Campylobacter jejuni*. *PloS one*, 10(3), e0121680. doi:10.1371/journal.pone.0121680

- Buret, A., Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., & Morck, D. J. J. C. M. (1999). The Calgary Biofilm Device: New. *J Clin Microbiol*, 37(6), 1771.
- Calvopina, K., Hinchliffe, P., Brem, J., Heesom, K. J., Johnson, S., Cain, R., . . . Avison, M. B. (2017). Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical beta-lactamase inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Mol Microbiol*, 106(3), 492-504. doi:10.1111/mmi.13831
- Castaneda, P., McLaren, A., Tavaziva, G., & Overstreet, D. (2016). Biofilm Antimicrobial Susceptibility Increases With Antimicrobial Exposure Time. *Clin Orthop Relat Res*, 474(7), 1659-1664. doi:10.1007/s11999-016-4700-z
- Castelo-Branco, D. S., Riello, G. B., Vasconcelos, D. C., Guedes, G. M., Serpa, R., Bandeira, T. J., . . . Brilhante, R. S. (2016). Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. *J Appl Microbiol*, 120(3), 600-606. doi:10.1111/jam.13027
- 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(6), 1771-1776. doi:10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999
- Chang, YT, Lin, CY, Chen, YH & Hsueh, PR 2015. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol*, 6: 893.
- Chawla, K, Vishwanath, S & Munim, FC 2013. Nonfermenting Gram-negative Bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Spp. Causing Respiratory Tract Infections in a Tertiary Care Center. *J Glob Infect Dis*, 5: 144-8.

- Chen, H., Zhang, B., Weir, M. D., Homayounfar, N., Fay, G. G., Martinho, F., . . . Xu, H. H. K. (2020). *S. mutans* gene-modification and antibacterial resin composite as dual strategy to suppress biofilm acid production and inhibit caries. *J Dent*, 93, 103278. doi:10.1016/j.jdent.2020.103278
- Chen, X., Thomsen, T. R., Winkler, H., & Xu, Y. (2020). Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal in vitro. *BMC Microbiol*, 20(1), 264. doi:10.1186/s12866-020-01947-9
- Chen, Y, Porter, V, Mubareka, S, Kotowich, L & Simor, AE 2015. Rapid identification of bacteria directly from positive blood cultures by use of a serum separator tube, smudge plate preparation, and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 53: 3349-3352.
- Cho, SY, Lee, DG, Choi, SM, Park, C, Chun, HS, Park, YJ, Choi, JK, Lee, HJ, Park, SH, Choi, JH & Yoo, JH 2015. *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection in patients with hematologic malignancies: a retrospective study and in vitro activities of antimicrobial combinations. *BMC Infect Dis*, 15: 69.
- Ciofu, O., Rojo-Molinero, E., Macia, M. D., & Oliver, A. (2017). Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*, 125(4), 304-319. doi:10.1111/apm.12673
- Cruz-Cordova, A, Mancilla-Rojano, J, Luna-Pineda, VM, Escalona-Venegas, G, Cazares-Dominguez, V, Ormsby, C, Franco-Hernandez, I, Zavala-Vega, S, Hernandez, MA, Medina-Pelcastre, M, Parra-Ortega, I, La Rosa-Zamboni, D, Ochoa, SA & Xicohtencatl-Cortes, J 2020. Molecular Epidemiology, Antibiotic Resistance, and Virulence Traits of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Associated With an Outbreak in a Mexican Tertiary Care Hospital. *Front Cell Infect Microbiol*, 10: 50.

- De Baets, F, Schelstraete, P, Haerynck, F, Van Biervliet, S, De Bruyne, R, Franckx, H & Van Daele, S 2014. *Achromobacter xylosoxidans* induced bronchiolitis obliterans in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 49: 414-416.
- Devanga Ragupathi, NK & Veeraraghavan, B 2019. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 18: 7.
- Di Bonaventura, G., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I., Piccolomini, R. J. A. a., & chemotherapy. (2004). Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. 48(1), 151-160.
- Dickey, J., & Perrot, V. (2019). Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS one*, 14(1), e0209390. doi:10.1371/journal.pone.0209390
- Doi, Y, Poirel, L, Paterson, DL & Nordmann, P 2008. Characterization of a naturally occurring class D β -lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52: 1952-1956.
- Dupont, C, Jumas-Bilak, E, Michon, AL, Chiron, R & Marchandin, H 2017. Impact of High Diversity of *Achromobacter* Populations within Cystic Fibrosis Sputum Samples on Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*, 55: 206-215.
- Edwards, B, Greysen-Wong, J, Somayaji, R, Waddell, B, Whelan, F, Storey, D, Rabin, H, Surette, M & Parkins, M 2017a. Prevalence and outcomes of *Achromobacter* species infections in adults with cystic fibrosis: a North American cohort study. *Journal of clinical microbiology*, 55: 2074-2085.

- El Chakhtoura, NG, Saade, E, Iovleva, A, Yasmin, M, Wilson, B, Perez, F & Bonomo, RA 2018. Therapies for multidrug resistant and extensively drug-resistant non-fermenting gram-negative bacteria causing nosocomial infections: a perilous journey toward 'molecularly targeted' therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 16: 89-110.
- El Chakhtoura, NG, Saade, E, Wilson, BM, Perez, F, Papp-Wallace, KM & Bonomo, RA 2017. A 17-year nationwide study of *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections among patients in the United States Veterans Health Administration. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65: 1327.
- El Salabi, A, Borra, PS, Toleman, MA, Samuelsen, Ø & Walsh, TR 2012. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56: 2241-2245.
- Elufisan, T. O., Luna, I. C. R., Oyedara, O. O., Varela, A. S., Garcia, V. B., Oluyide, B. O., . . . Guo, X. (2020). Antimicrobial susceptibility pattern of *Stenotrophomonas* species isolated from Mexico. *Afr Health Sci*, 20(1), 168-181. doi:10.4314/ahs.v20i1.22
- Farinas, MC & Martinez-Martinez, L 2013. [Multiresistant Gram-negative bacterial infections: *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31: 402-9.

- Filipic, B, Malesevic, M, Vasiljevic, Z, Lukic, J, Novovic, K, Kojic, M & Jovcic, B 2017. Uncovering Differences in Virulence Markers Associated with *Achromobacter* Species of CF and Non-CF Origin. *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 224.
- Flores-Trevino, S, Bocanegra-Ibarias, P, Camacho-Ortiz, A, Morfin-Otero, R, Salazar-Sesatty, HA & Garza-Gonzalez, E 2019. *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 17: 877-893.
- Flores-Trevino, S., Bocanegra-Ibarias, P., Camacho-Ortiz, A., Morfin-Otero, R., Salazar-Sesatty, H. A., & Garza-Gonzalez, E. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 17(11), 877-893. doi:10.1080/14787210.2019.1685875
- Flores-Trevino, S., Gutierrez-Ferman, J. L., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Estrada-Rivadeneira, D., Rivas-Morales, C., . . . Garza-Gonzalez, E. (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J Med Microbiol*, 63(Pt 11), 1524-1530. doi:10.1099/jmm.0.074385-0
- Ford, BA & Burnham, C-aD 2013. Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *Journal of clinical microbiology*, 51: 1412-1420.
- Frost, F., Shaw, M., & Nazareth, D. (2019). Antibiotic therapy for chronic infection with *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 6(6), CD013079. doi:10.1002/14651858.CD013079.pub2

- Fux, C. A., Wilson, S., & Stoodley, P. (2004). Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *J Bacteriol*, 186(14), 4486-4491. doi:10.1128/JB.186.14.4486-4491.2004
- Gashaw, M, Berhane, M, Bekele, S, Kibru, G, Teshager, L, Yilma, Y, Ahmed, Y, Fentahun, N, Assefa, H, Wieser, A, Gudina, EK & Ali, S 2018. Emergence of high drug resistant bacterial isolates from patients with health care associated infections at Jimma University medical center: a cross sectional study. *Antimicrob Resist Infect Control*, 7: 138.
- Gautam, V., Shafiq, N., Singh, M., Ray, P., Singhal, L., Jaiswal, N. P., . . . Agarwal, A. (2015). Clinical and in vitro evidence for the antimicrobial therapy in *Burkholderia cepacia* complex infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13(5), 629-663. doi:10.1586/14787210.2015.1025056
- 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. *Perit Dial Int*, 30(6), 652-656. doi:10.3747/pdi.2010.00010
- Glowicz, J, Crist, M, Gould, C, Moulton-Meissner, H, Noble-Wang, J, De Man, TJB, Perry, KA, Miller, Z, Yang, WC, Langille, S, Ross, J, Garcia, B, Kim, J, Epon, E, Black, S, Pacilli, M, Lipuma, JJ, Fagan, R & Workgroup, BCI 2018. A multistate investigation of health care-associated *Burkholderia cepacia* complex infections related to liquid docusate sodium contamination, January-October 2016. *Am J Infect Control*, 46: 649-655.
- Hand, E., Davis, H., Kim, T., & Duhon, B. (2016). Monotherapy with minocycline or trimethoprim/sulfamethoxazole for treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *J Antimicrob Chemother*, 71(4), 1071-1075. doi:10.1093/jac/dkv456

- Handal, N., Bakken Jorgensen, S., Smith Tunsjo, H., Johnsen, B. O., & Leegaard, T. M. (2015). Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles. *APMIS*, 123(9), 749-758. doi:10.1111/apm.12410
- Hernández-Gómez, C, Blanco, VM, Motoa, G, Correa, A, Maya, JJ, De La Cadena, E, Perengüez, M, Rojas, L, Hernández, A, Vallejo, M & Villegas, MV 2014. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*, 34: 91-100.
- Herrera-Heredia, S. A., Pezina-Cantu, C., Garza-Gonzalez, E., Bocanegra-Ibarias, P., Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., . . . Flores-Trevino, S. (2017). Risk factors and molecular mechanisms associated with trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico. *J Med Microbiol*, 66(8), 1102-1109. doi:10.1099/jmm.0.000550
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*, 39(5), 649-669. doi:10.1093/femsre/fuv015
- Horsley, A., & Jones, A. M. (2012). Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD009529. doi:10.1002/14651858.CD009529.pub2
- Huang, T.-P., Somers, E. B., & Wong, A. C. L. J. J. o. b. (2006). Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. 188(8), 3116-3120.

- Huang, Y. T., Chen, J. M., Ho, B. C., Wu, Z. Y., Kuo, R. C., & Liu, P. Y. (2018). Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Stenotrophomonas acidaminiphila* Reveal Evolutionary Insights Into Sulfamethoxazole Resistance. *Front Microbiol*, 9, 1013. doi:10.3389/fmicb.2018.01013
- Jakobsen, T. H., Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Givskov, M., & Hoiby, N. (2013). Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. *Future Microbiol*, 8(7), 901-921. doi:10.2217/fmb.13.57
- Jiang, Y., Geng, M., & Bai, L. (2020). Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms*, 8(8). doi:10.3390/microorganisms8081222
- Jiao, Y., Tay, F. R., Niu, L. N., & Chen, J. H. (2019). Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. *Int J Oral Sci*, 11(3), 28. doi:10.1038/s41368-019-0062-1
- Kang, X. M., Wang, F. F., Zhang, H., Zhang, Q., & Qiana, W. (2015). Genome-wide identification of genes necessary for biofilm formation by nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* reveals that orphan response regulator FsnR is a critical modulator. *Appl Environ Microbiol*, 81(4), 1200-1209. doi:10.1128/AEM.03408-14
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs*, 34(9), 737-751. doi:10.5301/ijao.5000027
- Kaplan, J. B., Mlynek, K. D., Hettiarachchi, H., Alamneh, Y. A., Biggemann, L., Zurawski, D. V., . . . Granick, M. S. (2018). Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide

resistance on pig skin in vivo. *PloS one*, 13(10), e0205526.
doi:10.1371/journal.pone.0205526

Kepenekli, E, Soysal, A, Yalindag-Ozturk, N, Ozgur, O, Ozcan, I, Devrim, I, Akar, S, Bakir, M & Turkish, P-HSG 2015. Healthcare-Associated Infections in Pediatric Intensive Care Units in Turkey: a National Point-Prevalence Survey. *Jpn J Infect Dis*, 68: 381-6.

Kırmusaoğlu, S. J. A., antibiotic resistance, antibiofilm strategies, & methods, a. (2019). The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. 152, 1-17.

Ko, J. H., Kang, C. I., Cornejo-Juarez, P., Yeh, K. M., Wang, C. H., Cho, S. Y., . . . Peck, K. R. (2019). Fluoroquinolones versus trimethoprim-sulfamethoxazole for the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 25(5), 546-554.
doi:10.1016/j.cmi.2018.11.008

Ko, S, An, HS, Bang, JH & Park, SW 2015. An outbreak of *Burkholderia cepacia* complex pseudobacteremia associated with intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution. *Am J Infect Control*, 43: 266-8.

Koch, AM, Nilsen, RM, Eriksen, HM, Cox, RJ & Harthug, S 2015. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004-2011. *Antimicrob Resist Infect Control*, 4: 57.

Kuang, X., Chen, V., & Xu, X. (2018). Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. *Biomed Res Int*, 2018, 6498932. doi:10.1155/2018/6498932

Lake, JG, Weiner, LM, Milstone, AM, Saiman, L, Magill, SS & See, I 2018. Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-

- Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 39: 1-11.
- Le, NK, Hf, W, Vu, PD, Khu, DTK, Le, HT, Hoang, BTN, Vo, VT, Lam, YM, Vu, DTV, Nguyen, TH, Thai, TQ, Nilsson, LE, Rydell, U, Nguyen, KV, Nadjm, B, Clarkson, L, Hanberger, H & Larsson, M 2016. High prevalence of hospital-acquired infections caused by gram-negative carbapenem resistant strains in Vietnamese pediatric ICUs: A multi-centre point prevalence survey. *Medicine (Baltimore)*, 95: e4099.
- Leber, AL 2020. *Clinical microbiology procedures handbook*, John Wiley & Sons.
- Lindsay, D., Killington, A., Fouhy, K., Loh, M., & Malakar, P. J. I. D. J. (2022). The CDC biofilm bioreactor is a suitable method to grow biofilms, and test their sanitiser susceptibilities, in the dairy context. 126, 105264.
- Lipuma, JJ 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*, 23: 299-323.
- Liu, W., Tian, X. Q., Wei, J. W., Ding, L. L., Qian, W., Liu, Z., & Wang, F. F. (2017). BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci Rep*, 7(1), 4665. doi:10.1038/s41598-017-04763-w
- Macia, M. D., Rojo-Molinero, E., & Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*, 20(10), 981-990. doi:10.1111/1469-0691.12651
- Magill, SS, Dumyati, G, Ray, SM & Fridkin, SK 2015. Evaluating Epidemiology and Improving Surveillance of Infections Associated with Health Care, United States. *Emerg Infect Dis*, 21: 1537-42.

- Malone, M., Goeres, D. M., Gosbell, I., Vickery, K., Jensen, S., & Stoodley, P. (2017). Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 15(2), 147-156. doi:10.1080/14787210.2017.1262257
- Mannaa, M, Park, I & Seo, YS 2018. Genomic Features and Insights into the Taxonomy, Virulence, and Benevolence of Plant-Associated Burkholderia Species. *Int J Mol Sci*, 20.
- Mayers, DL, Sobel, JD, Ouellette, M, Kaye, KS & Marchaim, D 2017. Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2, Springer.
- McKay, G. A., Woods, D. E., MacDonald, K. L., Poole, K. J. I., & immunity. (2003). Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. 71(6), 3068-3075.
- Mojica, M. F., Papp-Wallace, K. M., Taracila, M. A., Barnes, M. D., Rutter, J. D., Jacobs, M. R., . . . Bonomo, R. A. (2017). Avibactam Restores the Susceptibility of Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* to Aztreonam. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(10). doi:10.1128/AAC.00777-17
- Mojica, MF, Ouellette, CP, Leber, A, Becknell, MB, Ardura, MI, Perez, F, Shimamura, M, Bonomo, RA, Aitken, SL & Shelburne, SA 2016. Successful treatment of bloodstream infection due to metallo- β -lactamase-producing *Stenotrophomonas maltophilia* in a renal transplant patient. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60: 5130-5134.
- Montoya-Hinojosa, E, Bocanegra-Ibarias, P, Garza-Gonzalez, E, Alonso-Ambriz, OM, Salazar-Mata, GA, Villarreal-Trevino, L, Perez-Alba, E, Camacho-Ortiz, A, Morfin-Otero, R, Rodriguez-Noriega, E & Flores-Trevino, S 2020. Discrimination

- of biofilm-producing *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. *PLoS One*, 15: e0244751.
- Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdani, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdani, M., & Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38(11), 2005-2019. doi:10.1007/s10096-019-03641-9
- Nguyen, S. V., Edwards, D., Vaughn, E. L., Escobar, V., Ali, S., Doss, J. H., . . . Hauser, J. R. (2024). Expanding the *Stenotrophomonas maltophilia* complex: phylogenomic insights, proposal of *Stenotrophomonas forensis* sp. nov. and reclassification of two *Pseudomonas* species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 74(12). doi:10.1099/ijsem.0.006602
- Nielsen, S. M., Penstoft, L. N., & Nørskov-Lauritsen, N. (2019). Motility, Biofilm Formation and Antimicrobial Efflux of Sessile and Planktonic Cells of *Achromobacter xylosoxidans*. *Pathogens*, 8(1). doi:10.3390/pathogens8010014
- Nielsen, SM, Meyer, RL & Nørskov-Lauritsen, N 2017. Differences in Gene Expression Profiles between Early and Late Isolates in Monospecies *Achromobacter* Biofilm. *Pathogens*, 6.
- Nielsen, SM, Nørskov-Lauritsen, N, Bjarnsholt, T & Meyer, RL 2016. *Achromobacter* species isolated from cystic fibrosis patients reveal distinctly different biofilm morphotypes. *Microorganisms*, 4: 33.
- Nishimura, S., Tsurumoto, T., Yonekura, A., Adachi, K., & Shindo, H. (2006). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *J Orthop Sci*, 11(1), 46-50. doi:10.1007/s00776-005-0968-7

- Okoliegbe, I. N., Hijazi, K., Cooper, K., Ironside, C., & Gould, I. M. (2020). Longitudinal Surveillance and Combination Antimicrobial Susceptibility Testing of Multidrug-Resistant *Achromobacter* Species from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 64(11). doi:10.1128/AAC.01467-20
- Oliveira, J., & Reygaert, W. C. J. S. (2020). Gram negative bacteria.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, 66(2), 86-92.
- Osawa, K, Shigemura, K, Kitagawa, K, Tokimatsu, I & Fujisawa, M 2018. Risk factors for death from *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *J Infect Chemother*, 24: 632-636.
- Papp-Wallace, KM, Becka, SA, Taracila, MA, Zeiser, ET, Gatta, JA, Lipuma, JJ & Bonomo, RA 2017. Exploring the role of the Ω -loop in the evolution of ceftazidime resistance in the PenA β -lactamase from *Burkholderia multivorans*, an important cystic fibrosis pathogen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61.
- Papp-Wallace, KM, Taracila, MA, Gatta, JA, Ohuchi, N, Bonomo, RA & Nukaga, M 2013. Insights into beta-lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. *J Biol Chem*, 288: 19090-102.
- Parkins, M & Elborn, J 2011. Newer antibacterial agents and their potential role in cystic fibrosis pulmonary exacerbation management—authors' response. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66: 1198-1199.
- Parkins, MD & Floto, RA 2015. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14: 293-304.

- Patterson, SB, Mende, K, Li, P, Lu, D, Carson, ML, Murray, CK, Tribble, DR, Blyth, DM & Group, IT 2020. *Stenotrophomonas maltophilia* infections: Clinical characteristics in a military trauma population. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 96: 114953.
- Perez Barragan, E., Sandino Perez, J., Corbella, L., Orellana, M. A., & Fernandez-Ruiz, M. (2018). *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: clinical and microbiological features in a 10-year case series. *Rev Esp Quimioter*, 31(3), 268-273.
- Phu, VD, Wertheim, HF, Larsson, M, Nadjm, B, Dinh, Q-D, Nilsson, LE, Rydell, U, Le, TTD, Trinh, SH & Pham, HM 2016. Burden of hospital acquired infections and antimicrobial use in Vietnamese adult intensive care units. *PloS one*, 11: e0147544.
- Pires, D. P., Melo, L., Vilas Boas, D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol*, 39, 48-56. doi:10.1016/j.mib.2017.09.004
- Podnecky, NL, Rhodes, KA & Schweizer, HP 2015. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front Microbiol*, 6: 305.
- Pompilio, A., Crocetta, V., Verginelli, F., & Di Bonaventura, G. (2016). In vitro activity of levofloxacin against planktonic and biofilm *Stenotrophomonas maltophilia* lifestyles under conditions relevant to pulmonary infection in cystic fibrosis, and relationship with SmeDEF multidrug efflux pump expression. *FEMS Microbiol Lett*, 363(14). doi:10.1093/femsle/fnw145
- Pompilio, A., Ranalli, M., Piccirilli, A., Perilli, M., Vukovic, D., Savic, B., . . . Di Bonaventura, G. (2020). Biofilm Formation among *Stenotrophomonas maltophilia*

- Isolates Has Clinical Relevance: The ANSELM Prospective Multicenter Study. *Microorganisms*, 9(1). doi:10.3390/microorganisms9010049
- Porter, S, Ketheesan, N & Norton, R 2013. Bacteraemias in tropical Australia: changing trends over a 10-year period. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75: 266-270.
- Reza, A., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2019). Effectiveness of Efflux Pump Inhibitors as Biofilm Disruptors and Resistance Breakers in Gram-Negative (ESKAPEE) Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 8(4). doi:10.3390/antibiotics8040229
- Ridderberg, W, Nielsen, SM & Nørskov-Lauritsen, N 2015a. Genetic Adaptation of *Achromobacter* sp. during Persistence in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One*, 10: e0136790.
- Ridderberg, W, Nielsen, SM & Nørskov-Lauritsen, N 2015b. Genetic adaptation of *Achromobacter* sp. during persistence in the lungs of cystic fibrosis patients. *PLoS One*, 10: e0136790.
- Ridderberg, W, Wang, M & Nørskov-Lauritsen, N 2012. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. *Journal of clinical microbiology*, 50: 2688-2694.
- Righi, E, Girardis, M, Marchegiano, P, Venturelli, C, Tagliazucchi, S, Pecorari, M, Borsari, L, Carluccio, E, Codeluppi, M, Mussini, C & Aggazzotti, G 2013. Characteristics and outcome predictors of patients involved in an outbreak of *Burkholderia cepacia* complex. *J Hosp Infect*, 85: 73-5.

- Rolston, K. V. I., Gerges, B., Shelburne, S., Aitken, S. L., Raad, I., & Prince, R. A. (2020). Activity of Cefiderocol and Comparators against Isolates from Cancer Patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 64(5). doi:10.1128/AAC.01955-19
- Roschetto, E., Angrisano, T., Costa, V., Casalino, M., Forstner, K. U., Sharma, C. M., . . . De Gregorio, E. (2012). Functional characterization of the RNA chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol*, 194(21), 5864-5874. doi:10.1128/JB.00746-12
- Ruiz, T, Castellanos, G, Jf, AM, Riera, M & Collado, C 2019. Eradication of *Achromobacter* spp. multiresistente with colistin otic in patient with chronic otitis media suppurated. *Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 32: 569-570.
- Sader, H. S., & Jones, R. N. (2005). Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*, 25(2), 95-109. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.10.002
- Sader, HS, Farrell, DJ, Flamm, RK & Jones, RN 2014. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*, 43: 328-34.
- Saleem, Z, Godman, B, Hassali, MA, Hashmi, FK, Azhar, F & Rehman, IU 2019. Point prevalence surveys of health-care-associated infections: a systematic review. *Pathogens and global health*, 113: 191-205.
- Samonis, G, Karageorgopoulos, DE, Maraki, S, Levis, P, Dimopoulou, D, Spervasilis, NA, Kofteridis, DP & Falagas, ME 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*

- infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. *PloS one*, 7: e37375.
- Sánchez, MB 2015. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology*, 6: 658.
- Sandri, A., Veschetti, L., Saitta, G. M., Passarelli Mantovani, R., Carelli, M., Burlacchini, G., . . . Malerba, G. (2022). *Achromobacter* spp. Adaptation in Cystic Fibrosis Infection and Candidate Biomarkers of Antimicrobial Resistance. *Int J Mol Sci*, 23(16). doi:10.3390/ijms23169265
- Saxena, S., Banerjee, G., Garg, R., & Singh, M. (2014). Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *J Clin Diagn Res*, 8(5), DC09-11. doi:10.7860/JCDR/2014/7808.4330
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*, 8, 76. doi:10.1186/s13756-019-0533-3
- 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
- Sirijant, N., Sermswan, R. W., & Wongratanacheewin, S. (2016). *Burkholderia pseudomallei* resistance to antibiotics in biofilm-induced conditions is related to efflux pumps. *J Med Microbiol*, 65(11), 1296-1306. doi:10.1099/jmm.0.000358
- Sousa, SA, Feliciano, JR, Pita, T, Guerreiro, SI & Leitao, JH 2017. *Burkholderia cepacia* Complex Regulation of Virulence Gene Expression: A Review. *Genes (Basel)*, 8.

- Spencer, H. K., Spitznogle, S. L., Borjan, J., & Aitken, S. L. (2020). An Overview of the Treatment of Less Common Non-Lactose-Fermenting Gram-Negative Bacteria. *Pharmacotherapy*, 40(9), 936-951. doi:10.1002/phar.2447
- Spilker, T, Vandamme, P & Lipuma, JJ 2013. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12: 298-301.
- 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(8), 891-899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Strejcek, M., Smrhova, T., Junkova, P., & Uhlik, O. J. F. i. m. (2018). Whole-cell MALDI-TOF MS versus 16S rRNA gene analysis for identification and dereplication of recurrent bacterial isolates. 9, 1294.
- Suppiger, A., Schmid, N., Aguilar, C., Pessi, G., & Eberl, L. (2013). Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence*, 4(5), 400-409. doi:10.4161/viru.25338
- Swenson, C. E., & Sadikot, R. T. (2015). *Achromobacter* respiratory infections. *Ann Am Thorac Soc*, 12(2), 252-258. doi:10.1513/AnnalsATS.201406-288FR
- Tamma, P. D., Fan, Y., Bergman, Y., Sick-Samuels, A. C., Hsu, A. J., Timp, W., . . . Greenberg, D. E. (2018). Successful Treatment of Persistent *Burkholderia cepacia* Complex Bacteremia with Ceftazidime-Avibactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(4). doi:10.1128/AAC.02213-17

- Tekce, Y. T., Erbay, A., Cabadak, H., & Sen, S. (2012). Tigecycline as a therapeutic option in *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *J Chemother*, 24(3), 150-154. doi:10.1179/1120009X12Z.00000000022
- 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 Proced Online*, 21, 18. doi:10.1186/s12575-019-0106-0
- Tohamy, ST, Aboshanab, KM, El-Mahallawy, HA, El-Ansary, MR & Afifi, SS 2018. Prevalence of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from febrile neutropenic cancer patients with bloodstream infections in Egypt and new synergistic antibiotic combinations. *Infection and Drug Resistance*, 11: 791.
- Trancassini, M, Iebba, V, Citerà, N, Tuccio, V, Magni, A, Varesi, P, De Biase, RV, Totino, V, Santangelo, F & Gagliardi, A 2014. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Frontiers in microbiology*, 5: 138.
- Trifonova, A., & Strateva, T. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* - a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infect Dis (Lond)*, 51(3), 168-178. doi:10.1080/23744235.2018.1531145
- Van Acker, H., Sass, A., Bazzini, S., De Roy, K., Udine, C., Messiaen, T., . . . Coenye, T. (2013). Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PloS one*, 8(3), e58943. doi:10.1371/journal.pone.0058943

- Van Dalem, A., Herpol, M., Echahidi, F., Peeters, C., Wybo, I., De Wachter, E., . . . Pierard, D. (2018). In Vitro Susceptibility of Burkholderia cepacia Complex Isolated from Cystic Fibrosis Patients to Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(9). doi:10.1128/AAC.00590-18
- Vandamme, P., Moore, ER, Cnockaert, M., De Brandt, E, Svensson-Stadler, L, Houf, K, Spilker, T & Lipuma, JJ 2013. *Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicolens* sp. nov., *Achromobacter pulmonis* sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples. *Syst Appl Microbiol*, 36: 1-10.
- Vandamme, P. A., Peeters, C., Inganas, E., Cnockaert, M., Houf, K., Spilker, T., . . . LiPuma, J. J. (2016). Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66(9), 3708-3717. doi:10.1099/ijsem.0.001254
- Vandamme, P., Moore, E. R., Cnockaert, M., Peeters, C., Svensson-Stadler, L., Houf, K., . . . LiPuma, J. J. (2013). Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively. *Syst Appl Microbiol*, 36(7), 474-482. doi:10.1016/j.syapm.2013.06.005
- Velazquez-Acosta, C, Zarco-Marquez, S, Jimenez-Andrade, MC, Volkow-Fernandez, P & Cornejo-Juarez, P 2018. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia and pneumonia at a tertiary-care oncology center: a review of 16 years. *Support Care Cancer*, 26: 1953-1960.

- Vestby, L. K., Gronseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)*, 9(2). doi:10.3390/antibiotics9020059
- Wallner, A, King, E, Ngonkeu, ELM, Moulin, L & Bena, G 2019. Genomic analyses of *Burkholderia cenocepacia* reveal multiple species with differential host-adaptation to plants and humans. *BMC Genomics*, 20: 803.
- Wang, A., Wang, Q., Kudinha, T., Xiao, S., & Zhuo, C. (2016). Effects of Fluoroquinolones and Azithromycin on Biofilm Formation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci Rep*, 6, 29701. doi:10.1038/srep29701
- Willsey, GG, Eckstrom, K, Labauve, AE, Hinkel, LA, Schutz, K, Meagher, RJ, Lipuma, JJ & Wargo, MJ 2019. *Stenotrophomonas maltophilia* Differential Gene Expression in Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Reveals Shared and Cystic Fibrosis Strain-Specific Responses to the Sputum Environment. *J Bacteriol*, 201.
- Wolk, DM & Clark, AE 2018. Matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. *Clinics in laboratory medicine*, 38: 471-486.
- Wood, G. C., Jonap, B. L., Maish, G. O., 3rd, Magnotti, L. J., Swanson, J. M., Boucher, B. A., . . . Fabian, T. C. (2018). Treatment of *Achromobacter* Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Trauma Patients. *Ann Pharmacother*, 52(2), 120-125. doi:10.1177/1060028017730838
- Wood, G. C., Jonap, B. L., Maish, G. O., 3rd, Magnotti, L. J., Swanson, J. M., Boucher, B. A., . . . Fabian, T. C. (2018). Treatment of *Achromobacter* Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Trauma Patients. *Ann Pharmacother*, 52(2), 120-125. doi:10.1177/1060028017730838

- Wu, C. J., Lu, H. F., Lin, Y. T., Zhang, M. S., Li, L. H., & Yang, T. C. (2019). Substantial Contribution of SmeDEF, SmeVWX, SmQnr, and Heat Shock Response to Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol*, 10, 822. doi:10.3389/fmicb.2019.00822
- Yallew, WW, Kumie, A & Yehuala, FM 2016. Point prevalence of hospital-acquired infections in two teaching hospitals of Amhara region in Ethiopia. *Drug, healthcare and patient safety*, 8: 71.
- Yamamoto, M, Nagao, M, Hotta, G, Matsumura, Y, Matsushima, A, Ito, Y, Takakura, S & Ichiyama, S 2012. Molecular characterization of IMP-type metallo- β -lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 2110-2113.
- Yang, J. G., Shih, M. S., Kuo, W. T., Chin, K. H., Shen, G. H., & Chou, S. H. (2014). Crystallization of the N-terminal regulatory domain of the enhancer-binding protein FleQ from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 70(Pt 3), 326-330. doi:10.1107/S2053230X14001514
- Zeiser, E. T., Becka, S. A., Wilson, B. M., Barnes, M. D., LiPuma, J. J., & Papp-Wallace, K. M. (2019). "Switching Partners": Piperacillin-Avibactam Is a Highly Potent Combination against Multidrug-Resistant *Burkholderia cepacia* Complex and *Burkholderia gladioli* Cystic Fibrosis Isolates. *J Clin Microbiol*, 57(8). doi:10.1128/JCM.00181-19
- Zhanel, G. G., Baxter, M. R., Adam, H. J., Sutcliffe, J., & Karlowsky, J. A. (2018). In vitro activity of eravacycline against 2213 Gram-negative and 2424 Gram-positive bacterial pathogens isolated in Canadian hospital laboratories: CANWARD

surveillance study 2014-2015. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 91(1), 55-62.
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.12.013

Zhuo, C., Zhao, Q. Y., & Xiao, S. N. (2014). The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS one*, 9(10), e108409. doi:10.1371/journal.pone.0108409

11. Anexos