

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTES A METCILINA DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO

Por

Q.B.P. RODRIGO PÉREZ ANGUIANO

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

2025

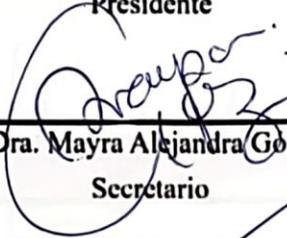
EFFECTO DE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTES A METICILINA DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO

Comité de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente



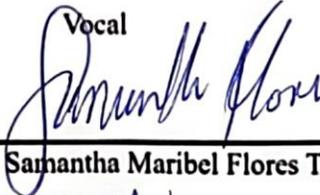
Dra. Mayra Alejandra Gomez Govea

Secretario



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal



Dr. Samantha Maribel Flores Treviño

Vocal



Dra. Verónica Villareal Salazar

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo  
Subdirector de Posgrado



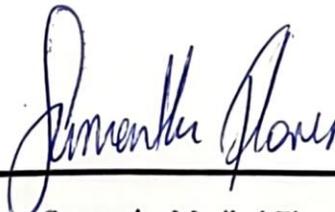
DIRECCIÓN DE POSGRADO

EFFECTO DE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN  
AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus* spp. RESISTENTES A METICILINA DE UN  
HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO



---

**Dra. Licet Villarreal Treviño**  
**Dirección de Tesis**



---

**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A la **Dra. Licet Villarreal Treviño** por permitirme trabajar bajo su cargo y formar parte importante de mi formación.

A la **Dra. Samantha Maribel Flores Treviño** por su asesoramiento, la motivación brindada y constante consejo.

A el **Dr. Juan Fco. Contreras Cordero**, la **Dra Mayra Alejandra Gómez Govea** y la **Dra. Verónica Villarreal Salazar** por formar parte de mi comité de tesis.

Al equipo de trabajo y estudiantes del Laboratorio de servicio de Infectología, especialmente a **Samantha Deyanira Villarreal Cruz** y **Edeer Iván Montoya Hinojosa**, grandes amigos.

A mis padres **Rodrigo Pérez Chávez** y **Leticia Anguiano Ortega** por siempre creer en mí.

A mi abuelita **Beatriz Chávez Rojas** por ser mi pilar y una gran persona en mi vida.

A **Eufemia Teresa López Correa**, quien estuvo constante en esta etapa tan importante de mi vida.

A **Xiomara Jazmín Maldonado Barrón**, por su grande amistad y gran apoyo.

A **Antonio Hernández, Janis Regina Guido, José Alberto Beltrán, Sandra Michelle Ruiz, Itzel Villanueva, Rogelio Miguel López, Roberto Manuel González, Isis Ivonne Colín, Eduardo Martínez, Valentín Treviño**, por su amistad incondicional.

## **Dedicatoria**

Con mucho amor a mi Teresita.

## ÍNDICE

PORTADA...	i
HOJA DE FIRMAS.....	ii
ÍNDICE.....	vii
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Generalidades del género <i>Staphylococcus</i> .....	2
2.2 Taxonomía y clasificación .....	2
2.3 Epidemiología e importancia clínica.....	3
2.4 Tratamiento.....	5
2.5 Resistencia a antibióticos.....	5
2.6 Patogenicidad y factores de virulencia .....	7
2.7 Producción de biopelícula .....	8
2.8 Resistencia a antibióticos en biopelícula .....	10
4. HIPÓTESIS .....	12
5. OBJETIVOS.....	13
6. MATERIAL Y METODOS .....	14
6.1 Sitio de estudio y selección de aislamientos.....	14
6.2 Identificación a nivel especie .....	14
6.3 Determinación de susceptibilidad a antibióticos .....	14
6.4 Determinación de la producción de la biopelícula .....	15
6.5 Determinación de la composición de la biopelícula.....	16
6.6 Determinación de la inhibición de biopelícula.....	16
6.7 Determinación de la erradicación de biopelícula.....	17
6.8 Análisis estadístico .....	17
7. RESULTADOS .....	19
7.1 Aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp.....	19
7.2 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en <i>Staphylococcus</i> spp. ....	19
7.3 Producción de biopelícula en aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a meticilina .....	20

7.4 Composición de biopelícula en aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
7.5 Susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas y de biopelícula .....	22
7.6 Efecto del nivel de producción de biopelícula sobre la resistencia antimicrobiana .....	24
7.7 Efecto de la composición de biopelícula sobre la resistencia antimicrobiana.....	24
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos clínicos aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp. de un hospital de tercer nivel de México.....	19
<b>Tabla 2.</b> Perfil de resistencia de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp. obtenidos de un hospital de tercer nivel de México....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Nivel de producción de biopelícula de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp..	21
<b>Figura 2.</b> Composición de biopelícula en aislamiento de <i>Staphylococcus</i> spp. Se muestran los resultados divididos por el componente de la biopelícula (DNA, proteínas y carbohidratos)...	22
<b>Figura 3.</b> Efecto antimicrobiano de antibióticos sobre células planctónicas y de biopelícula de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp. MIC, MBIC y MBEC de rifampicina (a), doxiciclina (b) y moxifloxacino (c). La línea punteada indica el punto de corte para MIC sugerido por el CLSI.....	23
<b>Figura 4.</b> Efecto del nivel de producción de biopelícula de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a meticilina sobre la resistencia a antibióticos. Se muestra la comparación de los MBIC y MBEC de rifampicina, doxiciclina y moxifloxacino en aislamientos con producción fuerte y moderada de biopelícula .....	24

## **SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

**ATCC:** Colección Americana de Cultivos Tipo

**CLSI:** Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio

**ECN:** estafilococos coagulasa negativos

**EPS:** exopolisacáridos

**HCCA:** ácido 4-bromo- $\alpha$ -cianocinámico

**MALDI-TOF MS:** espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo

**MBEC:** concentración mínima de erradicación de biopelícula

**MBIC:** concentración mínima de inhibición de biopelícula

**MFR:** mutlifarmacorresistencia

**MIC:** concentración mínima inhibitoria

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

**PBP:** proteína de unión a penicilina

**PSM:** modulinas fenol-solubles

## RESUMEN

*Staphylococcus* spp. son microorganismos que causan infecciones de piel y mucosas, bacteriemias e infecciones en tejido óseo. El tratamiento utilizado en contra de estas infecciones se ve comprometido por las cepas resistentes a antibióticos, así como también por cepas productoras de biopelícula, lo que dificulta la entrada de los antibióticos o la propia inactividad de estos contra la bacteria. Comprender cómo es que afectan estos mecanismos y factores de virulencia en estos microorganismos es primordial para ofrecer tratamientos adecuados. El objetivo de este estudio fue determinar la producción de biopelícula y su efecto en la resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. de un hospital de tercer nivel en México. Se utilizaron aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. los cuales se identificaron a nivel especie mediante MALDI-TOF MS. El perfil de resistencia a antibióticos se realizó mediante microdilución en caldo (MIC). La producción de biopelícula se evaluó mediante tinción con cristal violeta y determinando la densidad óptica. La composición de la biopelícula se evaluó mediante ensayos de desprendimiento. Las concentraciones mínimas de inhibición (MBIC) y erradicación (MBEC) de biopelícula se obtuvieron mediante el dispositivo de Calgary. De 652 aislamientos, se incluyeron *S. aureus* (n=536), *S. epidermidis* (n=70), *S. haemolyticus* (n=27), *S. hominis* (n=13) y *S. lugdunensis* (n=6). Las tasas de resistencia a meticilina fueron: *S. aureus* 37.3%, *S. epidermidis* 67.1%, *S. haemolyticus* 85.1%, *S. hominis* 38.4% y *S. lugdunensis* 66.6%. La producción de biopelícula en *S. aureus* fue 47.3%, 38.4% en *S. epidermidis*, 50% en *S. haemolyticus*, 100% en *S. hominis* y sin producción de biopelícula en *S. lugdunensis*. Los valores de MIC y MBIC para rifampicina, doxiciclina y moxifloxacino (con algunas excepciones) resultaron menores del punto de corte, pero las MBEC fueron mayores hasta 10 diluciones más. Existe alta producción de biopelícula en los aislamientos de las especies de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. hominis*. Los antibióticos lograron la inhibición de biopelículas, pero no su erradicación con las concentraciones probadas, lo que indica que estos antibióticos pueden actuar antes de que se formen las biopelículas y no después de su formación.

## ABSTRACT

*Staphylococcus* spp. they are microorganisms that cause skin and mucous membrane infections, bacteremia, and bone tissue infections. The treatment used against these infections is compromised by antibiotic-resistant strains, as well as by biofilm-producing strains, which makes it difficult for antibiotics to enter or their own inactivity against the bacteria. Understanding how these mechanisms and virulence factors affect these microorganisms is essential to offer adequate treatments. The objective of this study was to determine biofilm production and its effect on antibiotic resistance in clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from a tertiary hospital in Mexico. Clinical isolates of *Staphylococcus* spp. which were identified to species level using MALDI-TOF MS. Antibiotic resistance profiling was performed using broth microdilution (MIC). Biofilm production was assessed by crystal violet staining and determining optical density. Biofilm composition was evaluated by detachment assays. Biofilm minimum inhibition (MBIC) and eradication concentrations (MBEC) were obtained using the Calgary device. Of 652 isolates, *S. aureus* (n=536), *S. epidermidis* (n=70), *S. haemolyticus* (n=27), *S. hominis* (n=13), and *S. lugdunensis* (n=6) were included. The methicillin resistance rates were: *S. aureus* 37.3%, *S. epidermidis* 67.1%, *S. haemolyticus* 85.1%, *S. hominis* 38.4% and *S. lugdunensis* 66.6%. Biofilm production in *S. aureus* was 47.3%, 38.4% in *S. epidermidis*, 50% in *S. haemolyticus*, 100% in *S. hominis* and no biofilm production in *S. lugdunensis*. The MIC and MBIC values for rifampicin, doxycycline and moxifloxacin (with some exceptions) were lower than the cut-off point, but the MBEC were higher up to 10 more dilutions. There is high biofilm production in the isolates of the species of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. hominis*. The antibiotics achieved the inhibition of biofilms, but not their eradication with the concentrations tested, indicating that these antibiotics can act before biofilms form and not after their formation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos con alta capacidad de adaptación, incluyendo el ambiente nosocomial, favorecido por técnicas invasivas que facilitan la infección por parte de estos microorganismos (Tong *et al.*, 2015). Las infecciones pueden darse en piel, mucosas, tejido óseo, llegando a causar también bacteriemias, siendo la principal especie causal *Staphylococcus aureus* (Guo *et al.*, 2020).

El tratamiento indicado para combatir las infecciones provocadas por *Staphylococcus* spp. es principalmente el del grupo de los  $\beta$ -lactámicos, dentro de los cuales meticilina, neftacilina y otras penicilinas izoxalólicas son antibióticos de primera línea. También están indicadas cefalosporinas y carbapenémicos; y para combatir aquellas infecciones persistentes la administración de vancomicina o linezolid (López *et al.*, 2013). El uso de dispositivos médicos como implantes han contribuido a que existan cada vez más infecciones causadas por el género *Staphylococcus* (Orozco, 2016).

Algunas otras especies de este género, estafilococos coagulasa negativos (ECN), son bacterias oportunistas y son frecuentes patógenos nosocomiales que en los últimos años también han adquirido resistencia a diferentes antibióticos como consecuencia de diferentes mecanismos intrínsecos y extrínsecos (Ortega *et al.*, 2019).

Unas de las causas que esta especie se disemine provocando infecciones es la capacidad de adquirir genes de resistencia a antibióticos de primera línea (Foster, 2017). Un factor de virulencia presente en *Staphylococcus* spp. es la capacidad de síntesis de biopelícula. Esta estructura está compuesta de una matriz de exopolisacáridos (EPS) que confiere protección a las bacterias contra el sistema inmunitario del huésped y contra una amplia gama de fármacos (Pasachova *et al.*, 2019).

Comprender los mecanismos de resistencia a antibióticos y los factores de virulencia implicados en el curso de las infecciones provocadas por este tipo de microorganismos es primordial en el ámbito clínico. El entendimiento de cómo se desarrollan estos mecanismos puede mejorar las terapias utilizadas y por ende mejorar la recuperación de los pacientes, disminuyendo su estancia en las salas intrahospitalarias.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Generalidades del género *Staphylococcus***

El género *Staphylococcus* spp. pertenece al grupo de bacterias Gram positivas, miden aproximadamente 1 µm de diámetro, son cocoides, anaerobios facultativos, aunque también pueden crecer por fermentación. No poseen la capacidad de motilidad ni son formadores de esporas. En cuanto a su disposición al crecer, forman grupos o parejas y cadenas cortas. Bioquímicamente son catalasa positivos, y existen tanto coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*) como coagulasa negativos (Pasachova *et al.*, 2019).

Sus colonias en medios no selectivos convencionales miden aproximadamente de 1 a 3 mm de diámetro, son lisas, ligeramente elevadas, convexas y de un color ligeramente amarillo a blanco. En medio agar sangre se observa un halo alrededor de las colonias correspondiente a la beta hemólisis. Este género es capaz de soportar ambientes salinos (7.5% de NaCl) por lo que ésta supone una característica selectiva y se les puede aislar en medios como agar sal y manitol (Cervantes *et al.*, 2014).

Este género está dividido por la capacidad de producir la enzima coagulasa que convierte la fibrina en fibrinógeno y a su vez provoca la coagulación de la sangre del plasma sanguíneo. Anteriormente solo se consideraba como coagulasa positivo a la especie *S. aureus*, sin embargo, recientemente se ha reportado las especies *Staphylococcus argenteus* y *Staphylococcus schweitzeri* como productoras de esta enzima (Becker *et al.*, 2019). Por otra parte, el grupo conformado por los estafilococos coagulasa negativos (ECN) es extenso en cuanto al número de especies que lo comprenden, donde se reportan más de 50 especies, de las cuales al menos 15 son habitantes regulares de la microbiota en la piel del ser humano y de las que se pueden destacar las especies de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus haemolyticus* (Becker *et al.*, 2014).

### **2.2 Taxonomía y clasificación**

Tal como ha sucedido con otros géneros bacterianos, la clasificación de los estafilococos ha sido caracterizada por reclasificaciones y renombramientos de especies. Principalmente debido a la falta de herramientas moleculares que ayudaran a una correcta y más adecuada clasificación. Hasta el año 1874 Billroth propuso llamar al género “*Cocobacteria*” y fue Ogston en 1882 quien propuso primero el nombre de

“*Staphylococcus*” para este género y de los cuales su principal característica era la de ser aislado de heridas infectadas (Becker *et al.*, 2014).

Más adelante con la ayuda de filogenia molecular se descubrió que varios cocos Gram positivos y catalasa positivos no estaban relacionados, llevando esto a la clasificación de diferentes familias como *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*, y *Listeriaceae*, etc., siendo todas pertenecientes al orden de Bacillales, clase Bacilli y *phylum* Firmicutes.

Una de las características importantes que se introdujo para el año 1940 para diferenciar especies dentro de este género, fue la capacidad para producir la enzima coagulasa (Fairbrother, 1940). Solo las especies de *S. aureus*, *S. argenteus* y *S. schweitzeri* tienen la capacidad de producir la enzima coagulasa siendo la primera de éstas un patógeno verdadero. Sin embargo, es importante mencionar que las cepas resistentes a meticilina de las especies de *S. argenteus* y *S. schweitzeri* deben ser reportadas como MRSA (Becker *et al.*, 2019). Además de las especies más importantes dentro del grupo de ECN como son *S. epidermidis*, *S. hominis* y *S. haemolyticus*, también se han reportado las siguientes especies: *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lentus*, y *Staphylococcus chromogenes*.

### **2.3 Epidemiología e importancia clínica**

Según datos de los primeros estudios en donde se aplicó un enfoque utilizando tecnologías convencionales como medios de cultivo, los análisis metagenómicos revelaron que los estafilococos crecen óptimamente en áreas de mayor humedad, entre las cuales se encuentran infecciones en la piel, mucosas y zonas cavitarias (Galarce *et al.*, 2016). Inclusive las fosas nasales son un ambiente propicio para el crecimiento de no solo *S. aureus*, sino también por ECN.

En el año 2012 en un hospital de Murcia, España, en diversas salas hospitalarias como lo son: neurocirugía, unidad de quemaduras, cirugía cardiovascular y unidad de trasplantes se realizó un estudio prospectivo y observacional en pacientes cuyos hemocultivos positivos para ECN. En dicho estudio, el 92% de los pacientes evolucionaron hacia la curación mientras que el 8% fallecieron. De estos fallecimientos se encontraba relación

con la bacteriemia por ECN. *S. epidermidis* fue el ECN más frecuentemente encontrado (Fernández-Rufete *et al.*, 2012).

Se estima que cerca del 30% de la población mundial está colonizada con *S. aureus*, lo que ha llevado a que existan diferentes infecciones asociadas a esta especie las cuales son: bacteriemia, endocarditis, infecciones de la piel y tejidos blandos e infecciones osteoarticulares; así como también infecciones asociadas a dispositivos protésicos (Tong *et al.*, 2015). Existe un especial interés en el significado clínico de los ECN el cual es difícil de entender en muchas situaciones, ya que se presentan como comensales de la piel y mucosas por lo que se les considera mayormente inocuos o patógenos oportunistas con una virulencia escasa. Sin embargo, en los últimos años los ECN han tomado importancia como agentes causales de bacteriemia e infecciones asociadas a dispositivos médicos invasivos y catéteres, añadiendo además la creciente tasa de resistencia a distintas clases de antimicrobianos (Cercenado, 2016).

La importancia clínica tanto de *S. aureus* como de los ECN en infecciones intrahospitalarias ha ido en aumento debido a una creciente tasa de pacientes inmunodeprimidos que son sometidos a instrumentación diagnóstica o terapéutica. Además, las infecciones asociadas a la salud también han incrementado principalmente por dispositivos protésicos, las cuales pueden estar impulsadas por distintos factores de virulencia (Tong *et al.*, 2015). Las manifestaciones clínicas de las afectaciones provocadas por ECN son a menudo leves e inespecíficas y la mortalidad por bacteriemia es baja si es tratada de manera rápida y correcta, y agravándose en casos donde el paciente se encuentra inmunodeprimido o cuando se ven implicadas especies de ECN con distintos factores de virulencia (Molinos & Giménez, 1988).

Las afectaciones provocadas por ECN se manifiestan como enfermedades menos graves y hasta subagudas, sin embargo, en la actualidad, y con el avance de la medicina, se ha reportado un incremento en la tasa de prevalencia en infecciones y además se presentan como aislamientos con un extenso perfil de resistencia a diferentes antibióticos (Michels *et al.*, 2021). La excepción a la regla es *S. lugdunensis* que se comporta más como *S. aureus*, en especial por la gran virulencia y habilidad para producir infecciones más graves (Frank *et al.*, 2008).

*S. aureus* es la especie con mayor tasa de incidencia en infecciones relacionadas al torrente sanguíneo y que además se asocia con el consumo de alimentos, siendo aun mayor el porcentaje en aquellos países con mayor industrialización (Zendejas *et al.*, 2014) pero también se ha reportado que los ECN son uno de los principales agentes etiológicos asociados a bacteriemias relacionadas a catéteres (40-70%), peritonitis asociadas a contaminación de catéter en pacientes con diálisis peritoneal (20-50%), infecciones en las derivaciones ventrículo-atriales o ventrículo-peritoneales (33-64%), y de las endocarditis de válvulas protésicas (22-50%) y nativas (1-3%) (Predari, 2007).

## **2.4 Tratamiento**

La infección por *Staphylococcus* spp. puede ser tratada con antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos, siendo la nafcilina y las penicilinas isoxazólicas, como oxacilina, clocacilina, dicloxacilina y flucloxacilina, las que demuestran una mayor efectividad, con una actividad 4 a 8 veces más que la meticilina. También se ha observado que la asociación de un  $\beta$ -lactámico con fosfomicina, cicloserina o daptomicina funciona de manera sinérgica. Por su parte, cefoxitina demuestra sinergismo con penicilinas isoxazólicas frente a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Los carbapenémicos como lo son imipenem, doripenem, meropenem y ertapenem, son el grupo de  $\beta$ -lactámicos que tienen una mayor actividad intrínseca frente a cepas susceptibles a meticilina. Otro grupo es el de las cefalosporinas las cuales en orden decreciente de efectividad contra cepas MRSA se pueden clasificar de la siguiente manera: cefazolina y cefuroxima, ceftriaxona y cefepima, cefoxitina y cefocinid, y ceftazidima (Soriano *et al.*, 2013).

## **2.5 Resistencia a antibióticos**

La resistencia antimicrobiana se puede clasificar por dos factores: aquellos que “no han estado dentro del entorno intrahospitalario”, y son susceptibles a agentes antimicrobianos aplicados; y aquellos que han sido expuestos a la presión selectiva de antibióticos dentro del entorno nosocomial, lo que lleva a la diversidad en la resistencia a diferentes antibióticos y que a su vez se logre una mayor efectividad en cuanto a la colonización de diferentes tejidos durante una infección (Aties *et al.*, 2017).

Ya en décadas anteriores se ha registrado una creciente tasa de resistencia hacia la mayoría de los antibióticos por parte del género de *Staphylococcus*. Particularmente hacia penicilina, oxacilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina y gentamicina. Se presume que, tanto los ECN de origen animal como humano son un importante reservorio de elementos genéticos que confieren resistencia no solo a  $\beta$ -lactámicos, sino también a otros grupos de antibióticos (Becker *et al.*, 2014).

Existe multifarmacoresistencia (MFR) por parte de *Staphylococcus* spp., lo que se ha estudiado mediante caracterización fenotípica de los patrones de resistencia y en la detección de los genes que codifican para las proteínas que generan esta resistencia. Algunos de los genes implicados son *mecA*, *erm*, *msrA*, y *aac(6')/aph(2'')* los cuales se presume que son los posibles responsables de resistencia para meticilina, gentamicina y eritromicina, respectivamente (Castellano *et al.*, 2016).

Con el descubrimiento de la penicilina para la década de 1940, las infecciones causadas por *S. aureus* habían sido bien controladas. Sin embargo, para la década de 1950, y debido al uso indiscriminado de este antibiótico, comenzaron a aparecer cepas de este género que presentaban un perfil de resistencia, debido la enzima  $\beta$ -lactamasa. Más tarde se empleó el uso de la meticilina, una nueva penicilina semisintética cuyo mecanismo de acción se lleva a cabo mediante la unión a la proteína de unión a penicilina (PBP) (Urbina-Daza *et al.*, 2019), la cual es un componente de la membrana bacteriana.

Para el año 1961 aparecieron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). La resistencia a meticilina por parte del género *Staphylococcus* se había reportado principalmente en *S. aureus*, sin embargo, se ha venido reportando esta resistencia en aislamientos de cepas pertenecientes a los grupos de ECN (Galarce *et al.*, 2016). Dicha resistencia esta mediada por un mecanismo el cual está codificado principalmente por el gen *mecA*, el cual produce una modificación en la proteína de unión a penicilina alterada (PBP2a), en la pared celular, lo cual provoca que la meticilina no ejerza su propiedad de antibiótico en su blanco terapéutico (Xu *et al.*, 2021). En condiciones normales la proteína constitutiva PBP, al unirse a la meticilina, formaría un complejo Michaelis, el cual es seguido por el ataque nucleofílico de un residuo de serina en el anillo  $\beta$ -lactámico para dar como resultado acyl-PBP, un intermediario covalente estable. PBP2a provoca que exista una formación ineficiente de este último complejo,

indicado por un ajuste pobre en el anillo  $\beta$ -lactámico (Lim & Strynadka, 2002). Algunas investigaciones indican que la expresión del gen *mecA* existe únicamente en cepas bacterianas que ha sido expuestas previamente ante el antibiótico, en este caso meticilina (Peacock & Paterson, 2015). Recientemente también se ha reportado una proteína PBP2a codificada por el gen *mecC* con un porcentaje de similitud del 63% a la codificada por el gen *mecA* (Foster, 2017).

En un estudio realizado en 2019 se trabajó con cepas de ECN resistentes a meticilina, encontrándose el genotipo *mecA* en seis de ocho cepas, mientras que en otro estudio realizado en 2022 se trabajó tanto con cepas susceptibles como resistentes a meticilina encontrándose una tasa de prevalencia de 100% para este mismo gen en aquellas cepas que resultaron resistentes a meticilina (García *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

En cuanto a la resistencia reportada para cepas de *S. aureus* en el año 2012, según un estudio realizado en Monterrey, Nuevo León donde se trabajó con aislamientos clínicos, la resistencia a meticilina fue del 62% (Llaca-Díaz *et al.*, 2013). Es importante señalar que la tasa de resistencia por parte de los ECN a meticilina también es alta con porcentajes del 50 al 60% (Cercenado, 2016).

## **2.6 Patogenicidad y factores de virulencia**

Se conoce menos sobre los mecanismos de virulencia de los ECN que de *S. aureus*, con excepción de la formación de biopelícula por parte de *S. epidermidis*. Los ECN, en general, no poseen los factores determinantes de virulencia para generar una agresión en el huésped. Sin embargo, distintos factores de carácter multifuncional son los que pueden apoyar la colonización exitosa en la interacción bacteria-huésped (Becker *et al.*, 2014).

En general, *Staphylococcus* spp. son causantes de infecciones crónicas, persistentes y difíciles de tratar con antimicrobianos convencionales, esto es debido a que estos grupos de bacterias en el entorno intrahospitalario son poseedoras de genes implicados en la resistencia a antibióticos sumado a la formación de biopelícula. Las células dentro de la biopelícula se encuentran protegidas tanto de la respuesta inmunitaria del huésped como de la actividad de las moléculas con actividad antimicrobiana (Ortega *et al.*, 2019).

Aunque en general los ECN no son productores de toxinas, son capaces de secretar modulinas fenol-solubles (PSM). Las PSM son péptidos anfipáticos y  $\alpha$ -helicoidales que

poseen actividad tensioactiva, proinflamatoria y citolítica. Provocan lisis en osteoblastos, células epiteliales y endoteliales, eritrocitos y células polimorfonucleares.

El *quorum sensing* es el mecanismo regulador que controla la expresión de genes en función de la densidad celular y que en *Staphylococcus* spp. se denomina sistema Agr, el cual estimula la expresión de toxinas y enzimas como las proteasas y reprime la expresión de proteínas de adhesión al entrar en contacto en la fase estacionaria (Otto, 2013).

## **2.7 Producción de biopelícula**

La formación de una matriz tridimensional compuesta por una matriz de exopolisacáridos (EPS) y un consorcio bacteriano por parte de *Staphylococcus* spp. es un factor clave en la generación de infecciones debido a que esta característica les confiere una mayor capacidad de colonizar objetos inertes y superficies vivas. Esta matriz de EPS es conocida como biopelícula (Becker *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. presenta una estrecha relación con diversas infecciones asociadas con dispositivos invasivos, dentro de las que destacan las bacteriemias relacionadas con contaminación de catéter, infecciones de válvulas protésicas, peritonitis, endocarditis de válvulas protésicas y nativas, infecciones asociadas con otros dispositivos protésicos, abscesos superficiales, infecciones en la piel y mucosas, infecciones oftalmológicas postquirúrgicas e infecciones asociadas al tracto urinario (Fariña *et al.*, 2013).

Existen mecanismos de defensa del hospedero que actúan naturalmente contra las bacterias, por lo que la capacidad de sintetizar la biopelícula es una estrategia que le permite a los microorganismos escapar ante estos mecanismos, además que no permite un correcto funcionamiento de la actividad de los antimicrobianos, lo que conlleva a que exista una mayor tasa de infección provocada por bacterias productoras de biopelícula en comparación con aquellas que no poseen esta capacidad (Pinheiro *et al.*, 2015).

La biopelícula puede desarrollarse tanto en superficies abióticas, como por ejemplo dispositivos médicos; así como en superficies vivas como el tejido. Esta estructura protege a las bacterias del sistema inmunológico del hospedero evitando el reconocimiento por parte de este, además que dificulta la unión de los antibióticos con sus sitios diana, lo que

indica el porqué de la dificultad para tratar las infecciones bacterias con esta capacidad productora.

Se pueden reconocer tres etapas las cuales dan como resultado la formación de biopelícula. La primera de ellas es la etapa de adhesión y deben de presentarse una combinación de diferentes condiciones adecuadas de temperatura, osmolaridad, pH, presencia de hierro y oxígeno. Todas estas condiciones ambientales son importantes para que haya una adecuada unión entre células, así como también con la superficie a colonizar. Existen algunas proteínas que juegan un papel importante en esta etapa: proteínas de superficie, polisacárido/adhesinas capsulares (PS/A), autolisina y fibrillas poliméricas extracelulares. Para que se sintetice el polisacárido de adhesina intracelular debe de activarse el regulador *icaR* el cual se encuentra en el operón *ica*, y una vez activado se expresan los demás genes constituyentes en este operón (*icaABCD*).

La segunda etapa es la de maduración, donde ocurre un crecimiento de la biopelícula, el cual es producto del crecimiento bacteriano que se disemina por la superficie colonizada formando la matriz extracelular. Esta etapa es mediada por *quorum sensing* (QS), lo que permite que haya una comunicación bacteriana determinada por un proceso de señalización. En *S. aureus* el QS está mediado por el locus *agr* que está constituido por RNAII y RNAIII. Este sistema controla la densidad poblacional, la producción de autoinductores, que a su vez promueven la transcripción de RNAII y RNAIII.

La etapa de separación o diseminación es la última etapa de la formación de biopelícula, y comienza cuando el ambiente propio de esta estructura se encuentra sobresaturado o existe una escasez de nutrientes. En consecuencia, y debido a señales químicas, ocurre el desprendimiento de bacterias individuales o células planctónicas, las cuales pueden diseminarse hacia nuevas superficies para colonizarlas (Pasachova *et al.*, 2019).

Para lograr determinar la capacidad de producción de biopelícula por parte de *Staphylococcus* spp. se ha propuesto una metodología basada en medir la densidad óptica (DO) del fondo de una placa plástica la cual es teñida con cristal violeta. Esto se logra cultivando cepas del género *Staphylococcus* en microplacas de 96 pocillos, inoculando una determinada carga bacteriana que permita la formación de biopelícula en dado caso de que existiera la capacidad de producirla. La medición de únicamente la superficie teñida con cristal violeta en unidades de absorbancia relacionadas con la DO logra

clasificar las cepas como productoras y no productoras de biopelícula (Christensen *et al.*, 1985).

## **2.8 Resistencia a antibióticos en biopelícula**

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de biopelícula es un factor importante en la patogenicidad por parte de *Staphylococcus* spp., confiriendo protección contra el sistema inmune del hospedero, pero también contra antibióticos. La resistencia a antibióticos reportada en cepas productoras de biopelícula se ve incrementada varias veces en comparación a aquellas cepas que no son productoras (Saxena *et al.*, 2019). Las cepas en condiciones de biopelícula presentan una mayor resistencia a antibióticos convencionales y esta resistencia presenta una tendencia creciente (Guo *et al.*, 2020).

En los últimos años se han venido utilizando metodologías que logran con éxito la formación de biopelículas bajo determinadas condiciones, que además ofrecen la capacidad de examinar la actividad de los agentes antimicrobianos frente a este factor de virulencia. Una de estas tecnologías utiliza el dispositivo Calgary cuyo fundamento se basa en el crecimiento de la biopelícula bacteriana en clavijas suspendidas en medio de cultivo líquido, las cuales son transferidas a una microplaca de 96 pocillos con diluciones de antibióticos, para después ser transferidas nuevamente ahora a un medio de cultivo de recuperación, donde se evalúa la capacidad de crecimiento bacteriano después de la exposición de la biopelícula a los antimicrobianos (Macià *et al.*, 2014).

Se han llevado a cabo estudios que analizan la capacidad formadora de biopelícula en aislamientos de *Staphylococcus* spp. como el realizado por (Xu *et al.*, 2021) donde analizaron la capacidad formadora de biopelícula en aislamientos clínicos y ATCC de *Staphylococcus* spp. utilizando el dispositivo Calgary, donde además evaluaron la erradicación de biopelícula.

Sin embargo, en México existen escasos estudios centrados en la resistencia a antibióticos con relación a la producción de biopelícula, así como tampoco existen estudios suficientes de la composición de ésta.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

*Staphylococcus* spp. es uno de los géneros más importantes en infecciones nosocomiales, incluyendo bacteriemias. No solo *S. aureus* es agente causal de estas infecciones, sino que también se encuentran presentes algunas especies de ECN.

Una de las principales causas de las infecciones persistentes es la aparición de resistencia a antibióticos y la producción de biopelícula, lo que a menudo lleva al fracaso del tratamiento de elección.

En México existen escasos estudios centrados en la resistencia a antibióticos con relación a la producción de biopelícula, así como tampoco existen estudios suficientes de la composición de ésta.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina presentan alta producción de biopelícula.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar la producción de biopelícula y su efecto en la resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. de un hospital de tercer nivel en México

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Seleccionar e identificar aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. de un hospital de tercer nivel de México.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a antibióticos y seleccionar aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina.
3. Determinar la producción y composición de biopelícula en los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina.
4. Determinar la inhibición y erradicación de biopelícula por antibióticos convencionales en los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina productores de biopelícula.

## **6. MATERIAL Y METODOS**

### **6.1 Sitio de estudio y selección de aislamientos**

El presente trabajo incluyó 79 aislamientos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina, provenientes de diversos especímenes y recuperados de enero del año 2019 a diciembre del año 2022 del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el cual es un hospital de tercer nivel en Monterrey, Nuevo León.

### **6.2 Identificación a nivel especie**

La identificación a nivel especie se llevó a cabo mediante espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). Se tomaron aproximadamente 1-2 colonias de un cultivo joven de 24 h de incubación a 37 °C y se transfirieron con un aplicador de madera a una placa de acero inoxidable de 96 pocillos. Seguido a esto, se añadió 1 µl de ácido fórmico al 70 % (v/v) a cada pocillo, para facilitar la extracción de las proteínas. Se dejó secar a temperatura ambiente y se añadió 1 µl de la matriz HCCA (ácido 4-bromo- $\alpha$ -cianocinámico), para dejar secar también a temperatura ambiente. La placa se introdujo en el equipo (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania), el cual es controlado mediante el software flexControl 3.4 y se analizó mediante el software MALDI biotyper 4.0 para comparar los espectros correspondientes a las proteínas con los espectros en la base de datos del equipo. Para un criterio de identificación confiable se tomaron en cuenta una identificación segura para género y especie un score  $\geq 2.0$ ; para género solamente aquellas identificaciones con un score entre 1.5-2.0; y una identificación no confiable con un score  $\leq 1.5$ .

### **6.3 Determinación de susceptibilidad a antibióticos**

Para determinar el perfil de susceptibilidad se usó la técnica basada en microdilución con la ayuda del equipo Vitek®2 Compact (bioMérieux, Craaponne, France). A partir de un cultivo joven de 24 h se suspendieron colonias con un aplicador de madera en solución salina 0.85% (p/v) para ajustar a 0.5 de McFarland con la ayuda de un nefelómetro. De la solución ajustada se transfirieron 280 µl con la ayuda de una micropipeta a un tubo de ensayo con 3 ml de solución salina 0.85% (p/v). A este último tubo de ensayo se le

colocaron las tarjetas de identificación Vitek® 2GP (bioMérieux) que contienen los antibióticos y se colocaron en el equipo Vitek®2 Compact (bioMérieux). Una vez que el equipo leyó el código de barras de la tarjeta de antibióticos se procedió a completar los datos de ID y especie de la cepa en el software del equipo. Los datos de la concentración mínima inhibitoria (MIC) arrojados por el equipo se compararon con los criterios sugeridos por el CLSI para determinar el perfil de susceptibilidad (CLSI, 2024).

#### **6.4 Determinación de la producción de la biopelícula**

Se determinó por el método de tinción de microplaca con cristal violeta, siguiendo la metodología propuesta por Christensen *et al.* (1985). Se sembraron los aislamientos en agar sangre durante 24 h a 37°C, una colonia se transfirió de un cultivo axénico de 24 h en agar sangre a caldo soya tripticaseína (CST), se incubó durante 24 h a 37°C y se ajustó el inóculo a una turbidez correspondiente al 0.5 de la escala de McFarland. En una microplaca de fondo plano (Corning® Costar®, NY, USA) se colocaron los inóculos con una dilución previa de 1:100, con 200 µl de CST, junto con un control únicamente de CST, y los controles (*S. aureus* ATCC 29213 como control positivo y *S. hominis* ATCC 27844 como control negativo). Se eliminaron las células planctónicas descartando el sobrenadante, para después realizar tres lavados con 200 µl con buffer PBS 1X pH:7.2 y se dejó secar a temperatura ambiente. Para la fijación de la biopelícula se adicionaron 200 µl de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, se descartó el metanol y se dejó secar por completo a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos y se incubó durante 15 min. El cristal violeta se eliminó una vez transcurridos los 15 min y se realizaron lavados (5-8) con PBS 1X pH: 7.2 estéril para posteriormente dejar secar. Seguido de esto se agregaron 200 µl de etanol-acetona a una razón de 7:3 a cada pocillo y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para disolver el cristal violeta adherido a la biopelícula. La lectura de la densidad óptica (DO) se llevó a cabo en un lector de microplacas a 570 nm (iMark, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, Estados Unidos). El criterio de evaluación se llevó a cabo mediante los siguientes rangos de clasificación, una DO <0.120 se considera no productor, en el rango 0.120 a 0.240 como productor débil y DO > 0.240 como productor fuerte.

### **6.5 Determinación de la composición de la biopelícula**

Se realizaron ensayos de desprendimiento de biopelícula a aquellos aislamientos productores de biopelícula, utilizando distintos sustratos que degradan diferentes componentes del EPS de la biopelícula (carbohidratos, proteínas, ADN). A partir de un cultivo axénico de 24 h en agar sangre se transfirieron una colonia a caldo soya tripticaseína y se incubó durante 24 h a 37°C, para después realizar una dilución a razón 1:100 en CST estéril suplementado con 1% (p/v) de glucosa. De la anterior dilución se transfirieron 200 µl a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos y se incubó durante 24 h a 35°C. La fijación de la biopelícula se realizó añadiendo 200 µl de metanol absoluto durante 15 min, posteriormente se realizaron lavados y después se añadieron 200 µl a cada pocillo con el sustrato correspondiente: a) 40 mM de NaIO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en agua bidestilada, b) 0.1 mg/ml de proteinasa K (Bioline, Londres, UK) en 20 mM Tris-HCl a pH: 7.5 con 100 mM NaCl y c) 0.5 mg/ml DNasa I (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en 5 mM MgCl<sub>2</sub>. microplacas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Transcurridas las 24 h se le añadieron 200 µl de cristal violeta al 0.1% (p/v) durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se le añadieron 200 µl de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 durante 15 min a temperatura ambiente. La lectura de la DO se realizó en un lector de microplacas (iMark™, BioRad Laboratories Inc, CA, USA) a 595 nm. El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control. El criterio de evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera: < 10% sin desprendimiento, de 10 a 50% desprendimiento intermedio, de 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y >75% desprendimiento fuerte (Mendoza *et al.*, 2015). Los porcentajes más altos de desprendimiento se interpretaron como la composición de mayor abundancia de la biopelícula.

### **6.6 Determinación de la inhibición de biopelícula**

Para determinar la inhibición de biopelícula se utilizaron los aislamientos productores de biopelícula. Estos se incubaron durante 24 h a 37°C en agar sangre para posteriormente ajustar a 1.0 de McFarland, con la ayuda de un espectrofotómetro. Una vez ajustado el inóculo, se diluyó a razón de 1:150 en caldo Müeller-Hinton y se transfirieron 100 µl a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 100 µl de diluciones seriadas de los

diferentes antibióticos y se incubaron durante 24 h a 37°C. La microplaca sometió a sonicación con el equipo Ultrasonic Cleaning Bath (Branson Bransonic M Mechanical Bath 5800, Emerson, EUA) durante 5 min a 4 kHz e incubada durante 24 h a 37°C y se decantó el sobrenadante para después realizar tres lavados con agua estéril. Se dejó secar para después fijar la biopelícula con metanol al 99% durante 10 min, posteriormente se tiñe con cristal violeta al 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron lavados, y después se agregó alcohol-acetona a razón de 7:3 durante 20 min. Para determinar la concentración mínima de inhibición de biopelícula (MBIC) se observará la turbidez y el resultado será aquella concentración mínima en la cual se previene visiblemente el crecimiento de la biopelícula.

### **6.7 Determinación de la erradicación de biopelícula**

Para determinar la actividad de erradicación de biopelícula se realizó mediante el método de microdilución llevado a cabo en microplacas de 96 pocillos de Calgary (MBEC, Innovotech, AB, Canadá). Se incubaron los aislamientos durante 24 h a 37°C, para después ajustar el inóculo a 1.0 de la escala de McFarland con la ayuda de un espectrofotómetro. Se transfirieron 100 µl del inóculo diluido a razón de 1:150 en caldo Müeller-Hinton a una placa de Calgary de 96 pocillos. Se incubó durante 24 h a 37°C en constante agitación. La tapa del dispositivo Calgary que contiene las clavijas se lavó con PBS estéril para después colocar la tapa en otra placa de recuperación de 96 pocillos. Esta última placa de recuperación contiene 100 µl de diluciones seriadas de los diferentes antibióticos. La microplaca se incubó durante 24 h a 37 °C, la tapa con las clavijas se lavó, se colocó en otra placa de recuperación (placa fondo curvo) y se sometió a sonicación con el equipo Ultrasonic Cleaning Bath (Branson Bransonic M Mechanical Bath 5800, Emerson, EUA) a 40 kHz durante 5 min, se incubó nuevamente durante 24 h a 37°C. La determinación de la concentración mínima de erradicación de biopelícula (MBEC) fue aquella concentración mínima que no permita un crecimiento visible.

### **6.8 Análisis estadístico**

Se realizaron comparaciones entre los valores obtenidos de MIC con los valores MBEC y MBIC obtenidos de aquellos aislamientos resistentes, susceptibles y productoras de

biopelícula evaluándolos mediante la prueba ANOVA de un factor y Kruskal-Wallis. Se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con una  $p \leq 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp.

Se recuperaron 625 aislamientos clínicos del género *Staphylococcus* en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en el periodo comprendido entre enero 2019 a diciembre 2022. Las especies con mayores números de casos fueron *S. aureus* (n=536) y *S. epidermidis* (n=70), y en menor medida *S. haemolyticus* (n=27), *S. hominis* (n=13) y *S. lugdunensis* (n=6), siendo las siguientes características clínicas en donde se reportaron mayores tasas de infecciones por estas especies: pacientes masculinos, especímenes respiratorios y de tejidos; y la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Datos clínicos aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp. de un hospital de tercer nivel de México.</b>					
<b>Característica</b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>S. epidermidis</i></b>	<b><i>S. haemolyticus</i></b>	<b><i>S. hominis</i></b>	<b><i>S. lugdunensis</i></b>
	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>
<b>Total</b>	82.2 (536)	10.7 (70)	4.1 (27)	1.9 (13)	0.9 (6)
<b>Masculino</b>	66.9 (359)	61.4 (43)	77.7 (21)	61.5 (8)	50.0 (3)
<b>UCI</b>	25.5 (137)	15.7 (11)	16.6 (4)	23.0 (3)	16.6 (1)
<b>Espécimen</b>					
<b>Respiratorio</b>	43.2 (232)	7.1 (5)	11.1 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)
<b>Tejido</b>	19.4 (104)	22.8 (16)	40.7 (11)	46.1 (6)	66.6 (4)
<b>Osteosíntesis</b>	11.3 (61)	15.7 (11)	18.5 (5)	15.3 (2)	33.3 (2)
<b>Sangre</b>	3.3 (18)	38.5 (27)	14.8 (4)	38.4 (5)	0.0 (0)

### 7.2 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus* spp.

Los aislamientos de *Staphylococcus* spp. se sometieron a prueba de susceptibilidad antimicrobiana mediante microdilución utilizando el equipo Vitek®2. En la Tabla 2 se enlistan los antibióticos de mayor a menor en cuanto al número de aislamientos resistentes, siendo oxacilina (42%), levofloxacino (28%), clindamicina (26%) y ciprofloxacino (24%) aquellos antimicrobianos en los cuales se obtuvo una mayor tasa de resistencia. Se observó

una baja resistencia en antibióticos como daptomicina (4.7%), gentamicina (4.7%), tetraciclina (2.1%), rifampicina (0.1%), doxiciclina (0.9%) y linezolid (0.4%), sin resistencia reportada a vancomicina y tigeciclina.

**Tabla 2. Perfil de resistencia de aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de un hospital de tercer nivel de México.**

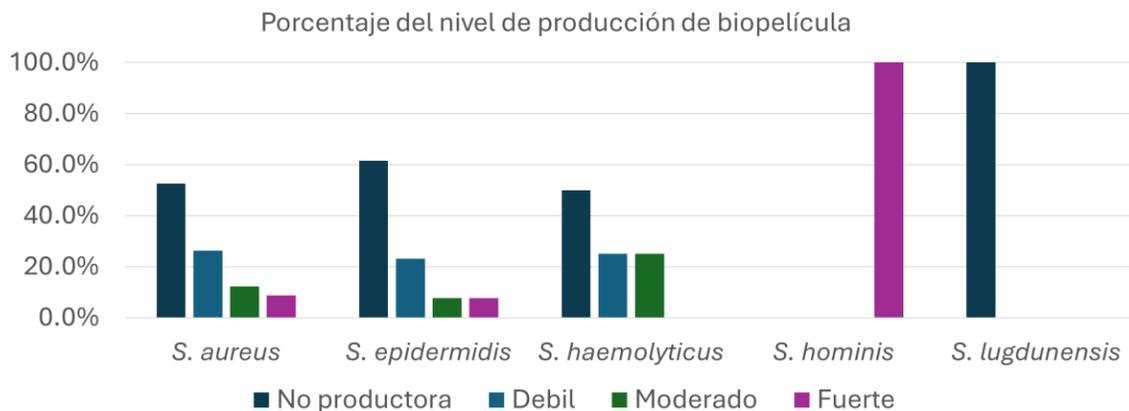
Antibióticos	<i>S. aureus</i> n=536	<i>S. epidermidis</i> n=70	<i>S. haemolyticus</i> n=27	<i>S. hominis</i> n=13	<i>S. lugdunensis</i> n=6
Oxacilina	37.3 (200)	67.1 (47)	85.1 (23)	38.4 (5)	66.6 (4)
Levofloxacino	26.6 (143)	31.4 (22)	70.3 (19)	0.0 (0)	33.3 (2)
Clindamicina	21.6 (116)	45.7 (32)	62.9 (17)	23.0 (3)	66.6 (4)
Ciprofloxacino	21.8 (117)	28.5 (20)	62.9 (17)	0.0 (0)	50.0 (3)
Moxifloxacino	21.8 (117)	24.2 (17)	59.2 (16)	0.0 (0)	66.6 (4)
Daptomicina	5.4 (29)	1.4 (1)	3.7 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
Gentamicina	0.1 (1)	27.1 (19)	37.0 (10)	0.0 (0)	16.6 (1)
Tetraciclina	0.3 (2)	10.0 (7)	18.5 (5)	0.0 (0)	0.0 (0)
Rifampicina	0.0 (0)	0.0 (0)	3.7 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
Doxiciclina	0.3 (2)	1.4 (1)	11.1 (3)	0.0 (0)	0.0 (0)
Linezolid	0.1 (1)	1.4 (1)	3.7 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)

### **7.3 Producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina**

Para los ensayos de producción de biopelícula se seleccionaron aislamientos resistentes a meticilina (n=79). El 46% de los aislamientos analizados resultaron productores de biopelícula (27 *S. aureus*, 5 *S. epidermidis*, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis*); de los cuales

el 51% resultaron productores débiles, 24% productores moderados y el 18% productores fuertes de biopelícula.

En la figura 1 se muestran los resultados de los ensayos de producción de biopelícula divididos por especie donde se demuestra el nivel de producción de biopelícula, siendo débilmente productoras de biopelícula el nivel de mayor porcentaje dentro de aquellas productoras de biopelícula, con 7 aislamientos dentro de la categoría de fuertemente productores (5 *S. aureus*, 1 *S. epidermidis* y 1 *S. haemolyticus*).



**Figura 1.** Nivel de producción de biopelícula de aislamientos de *Staphylococcus* spp.

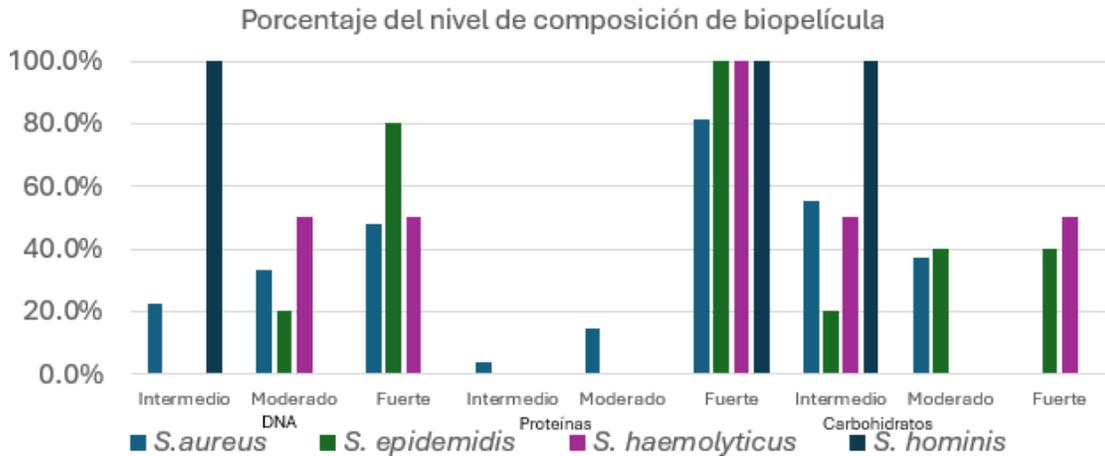
#### 7.4 Composición de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp

Los resultados de los ensayos de composición de biopelícula demostraron que el contenido de la biopelícula de los aislamientos analizados es heterogéneo.

Sin embargo, el contenido proteínico estuvo presente en mayor porcentaje seguido de ADN estructural (Figura 2), ya que las especies analizadas tuvieron un fuerte desprendimiento de proteínas en casi el 100% de los casos (únicamente *S. aureus* presentó desprendimiento moderado e intermedio de proteínas) después del tratamiento con proteinasa.

El desprendimiento de ADN después del tratamiento con DNAasa demostró que las especies mostraron un desprendimiento fuerte, llegando hasta el 80% de los casos como en *S. epidermidis*.

Por último, el desprendimiento en carbohidratos después del tratamiento con metaperyodato de sodio fue en su mayoría intermedio, aunque llegando al 50% de desprendimiento fuerte en las cepas de *S. haemolyticus*.



**Figura 2.** Composición de biopelícula en aislamiento de *Staphylococcus* spp. Se muestran los resultados divididos por el componente de la biopelícula (DNA, proteínas y carbohidratos).

### 7.5 Susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas y de biopelícula

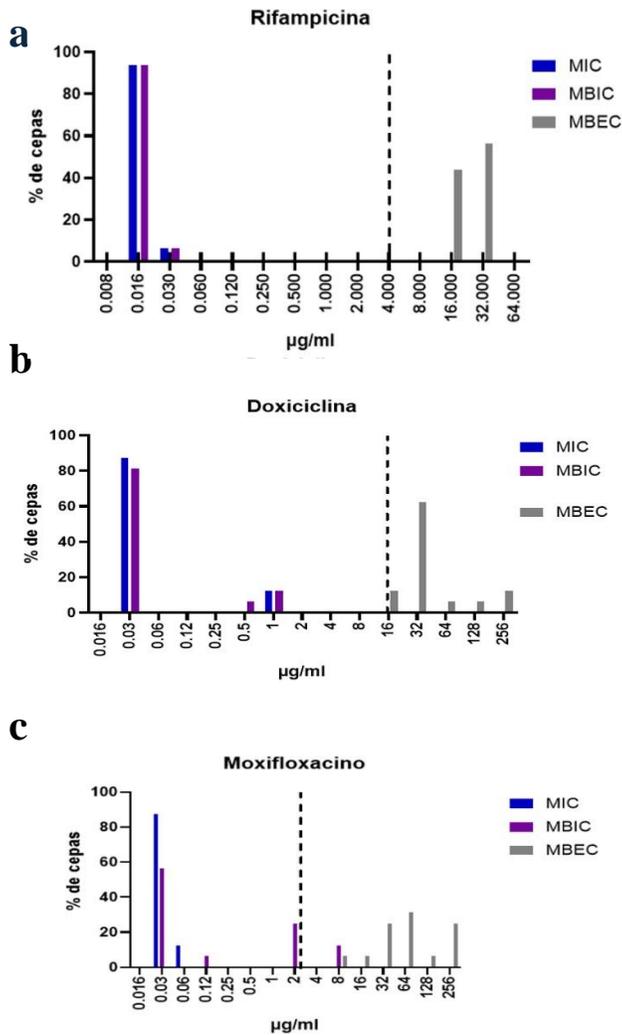
Las MBIC fueron menores que las MBEC. Para los antibióticos seleccionados se observó que las MBEC se aumentaron hasta 9 veces más en cuanto a la dilución en comparación con la MBIC de rifampicina y hasta 11 veces mayores para doxiciclina y moxifloxacino. En cuanto a las MBIC se observaron resultados favorables de inhibición y similares entre rifampicina y doxiciclina, con MBIC mayores en moxifloxacino.

En la figura 3 se observan las comparaciones entre MIC, MBIC y MBEC donde se puede observar que las MBEC para todos los aislamientos utilizados resultaron por encima del punto de corte sugerido para MIC por el CLSI. En solo el 15% de las cepas analizadas con moxifloxacino se sobrepasó el punto de corte con concentraciones de 8 µg/mL.

Los valores de MIC y MBIC para rifampicina, en su totalidad, resultaron menores o iguales a 0.030 µg/mL (por debajo del punto de corte) mientras que las MBEC fueron igual o mayores a 16 µg/mL (Figura 3a).

Los valores de MIC y MBIC para doxiciclina fueron menores a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (por debajo del punto de corte) mientras que las MBEC resultaron incluso con valores iguales o mayores a 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 3b).

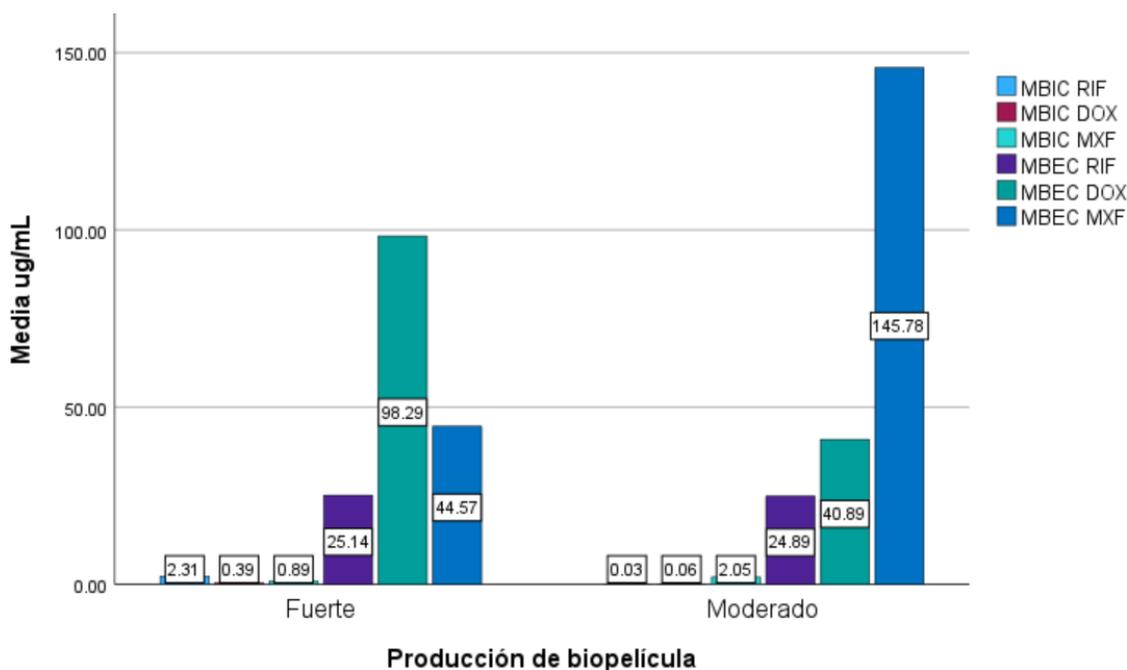
Los valores de MIC para moxifloxacino fueron menores a 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (por debajo del punto de corte), los valores de MBIC tuvieron un rango de 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mientras que las MBEC resultaron incluso con valores iguales o mayores a 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 3c).



**Figura 3. Efecto antimicrobiano de antibióticos sobre células planctónicas y de biopelícula de aislamientos de *Staphylococcus* spp.** MIC, MBIC y MBEC de rifampicina (a), doxiciclina (b) y moxifloxacino (c). La línea punteada indica el punto de corte para MIC sugerido por el CLSI.

### 7.6 Efecto del nivel de producción de biopelícula sobre la resistencia antimicrobiana

Las MBIC de doxiciclina en aislamientos fuertes productores de biopelícula fueron mayores que las MBIC en aislamientos moderadamente productores (Fig. 4;  $p < 0.05$ ). También se observó una diferencia significativa entre las MBEC de moxifloxacino obtenidas de aislamientos moderadamente productores contra las MBEC de aislamientos fuertemente productores (Fig. 4;  $p < 0.05$ ). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ningún otro grupo analizado.



**Figura 4. Efecto del nivel de producción de biopelícula de aislamientos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina sobre la resistencia a antibióticos.** Se muestra la comparación de los MBIC y MBEC de rifampicina, doxiciclina y moxifloxacino en aislamientos con producción fuerte y moderada de biopelícula.

### 7.7 Efecto de la composición de biopelícula sobre la resistencia antimicrobiana

El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ) demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las MBIC y MBEC de los antibióticos utilizados comparando entre los diferentes niveles de composición de la biopelícula de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina.

## 8. DISCUSIÓN

El género *Staphylococcus* es considerado como agente natural de la microbiota de piel y mucosas y se estima que el 30% de la población mundial sana se encuentra colonizada por *Staphylococcus* spp. Es un importante agente causal de infecciones intrahospitalarias, bacteriemias, osteomielitis y de piel y tejido (Saxena *et al.*, 2019). *S. aureus* se reporta con mayor frecuencia seguida por ECN en infecciones asociadas con dispositivos médicos invasivos, bacteriemias y en menor medida infecciones de tracto respiratorio y urinario.

En el área clínica es necesario realizar una identificación oportuna del agente infeccioso. La identificación se realizó mediante la tecnología MALDI-TOF MS, obteniendo aislamientos de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. lugdunensis*, con puntajes por encima de 2.0 lo que indican una identificación segura tanto para género como para especie. Un estudio realizado por Alcalá y colaboradores (2015) obtuvo resultados confiables para la identificación de aislamientos de *S. aureus*, esto comparando con métodos moleculares los cuales son considerados el estándar de oro. El uso de ácido fórmico como pretratamiento para el análisis proteómico facilita la lectura en bacterias Gram positivas. Cabe mencionar que la identificación a nivel especie de *Staphylococcus* spp. es complicada aun con la tecnología MALDI-TOF MS, pero demuestra una mejor fiabilidad en comparación con métodos bioquímicos o convencionales. El uso de la tecnología MALDI-TOF MS confiere determinadas ventajas sobre los métodos moleculares que pueden ser costosos y laboriosos, así como también sobre los métodos convencionales que se basan en pruebas bioquímicas y de cultivo en medios selectivos y/o diferenciales que pueden llegar a tomar varios días para su identificación.

Se estima que el género *Staphylococcus* es responsable de más de una alta tasa de las infecciones asociadas al entorno nosocomial, ubicándose en tal lugar debido a su capacidad de adherirse y proliferar tanto en superficies vivas e inertes. Esto es tanto en aislamientos de *S. aureus* como en ECN remarcándose la presencia de estos microorganismos en bacteriemias e infecciones relacionadas a prótesis articulares y de catéteres (Tong *et al.*, 2015). En este trabajo los especímenes de los cuales se recuperaron la mayor parte de aislamientos correspondieron a especímenes respiratorios seguido de especímenes provenientes de tejidos, lo que según Pérez y colaboradores (2022) se relaciona con la emergencia de la pandemia de COVID-19. Durante este periodo se

presentó una mayor tasa de morbilidad y mortalidad con distintos aislamientos bacterianos incluyendo *Staphylococcus* spp., aumentando los casos de mortalidad de 1.4% a más del 50% en pacientes con gripe común en comparación con aquellos con COVID-19, respectivamente.

Las complicaciones de las infecciones provocadas por *Staphylococcus* spp. se ven agravadas debido a la farmacorresistencia la cual es una problemática a nivel mundial y se le considera como “pandemia silenciosa” ubicándose entre las 10 problemáticas de salud a nivel mundial y estimándose un total de 10 millones de muertes para el año. A nivel mundial se reportan tasas de resistencia crecientes en la mayoría de los microorganismos para un gran número de antimicrobianos. Tan solo para el año de 2017 la CDC estimó que los aislamientos de MRSA provocaron un total de 323,700 casos que requirieron hospitalización y de los cuales 10,600 murieron; todo esto implicando además costos de alrededor de 1.7 billones de dólares (CDC, 2018).

En este trabajo se presentaron altos porcentajes de aislamientos resistentes a meticilina, levofloxacino, clindamicina, ciprofloxacino. Aunque los resultados entre especies demuestran variaciones en cuanto a las tasas de resistencia a meticilina, los porcentajes en los ECN van del 38% al 85% y del 37% en *S. aureus*. Lo anterior demuestra que en los últimos años las especies de ECN han pasado de comensales o microbiota natural a patógenos que son capaces de invadir y colonizar con éxito diferentes tejidos (Aties *et al.*, 2017). Aunque se obtuvieron tasas de resistencia menores de los estafilococos analizados en este trabajo hacia moxifloxacino, estas tasas fueron desde 22% para *S. aureus* y hasta el 59% para *S. haemolyticus*. Los resultados en general corresponden con resultados reportados por el Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría (2015) que indica que el tratamiento indicado con moxifloxacino suele tener una eficacia intermedia frente a aislamientos resistentes a meticilina.

Por su parte daptomicina, tetraciclina, rifampicina doxiciclina y linezolid demostraron bajas tasas de farmacorresistencia, inclusive con valores de 0% en las especies analizadas. No se demostró ningún aislamiento resistente frente a vancomicina. Como lo demuestran los resultados obtenidos por Picazo *et al.* (2010) los valores de MIC guardan relación con este trabajo tanto en cepas de MRSA como en ECN. Además, mencionan que la pérdida gradual de efectividad que se ha venido mostrando en cuanto a la actividad exhibida de

vancomicina, aunque los valores de MIC siguen interpretándose como susceptibles, han aumentado gradualmente.

Las infecciones que involucran a bacterias farmacorresistentes son de gran importancia debido a la gran dificultad que se tiene en el tratamiento. Esto se suma a la capacidad de formación de biopelícula, característica que confiere la capacidad de resistir de manera adecuada a la actividad de distintos antimicrobianos (Seng *et al.*, 2017). La producción de la biopelícula se asocia con una mayor virulencia debido a la protección conferida hacia el microorganismo contra las defensas del hospedador y antimicrobianos, propiciando la persistencia y dificultando su erradicación (Pasachova *et al.*, 2019). La biopelícula es un agregado de células bacterianas que se encuentran embebidas en una matriz polimérica extracelular. Esta matriz está compuesta por moléculas secretadas por la misma bacteria, principalmente proteínas, ADN extracelular y carbohidratos.

En este trabajo, 44.3% de los aislamientos mostraron ser productores de biopelícula, predominando los débiles productores, en su mayoría *S. aureus*. Un estudio realizado por Seng *et al.* (2017) demostró en cepas de ECN resistentes a meticilina, que los aislamientos obtenidos de entornos ambientales demostraron valores de producción de biopelícula correspondientes a no productores seguidos de productores débiles de biopelícula. Los resultados obtenidos en este trabajo se asemejan a los reportados en entornos nosocomiales. Aunque los porcentajes de aislamientos fuertemente productores fueron menores, esto puede deberse a diferencias en las metodologías, ya que en este trabajo se realizó una disolución de la biopelícula posteriormente a ser teñida con cristal violeta.

Por su parte, la composición de la biopelícula estafilocócica demostró ser heterogénea en sus componentes: proteínas, ADN extracelular y carbohidratos. Componentes que fungen un papel importante en las etapas de la formación de biopelícula para etapas como los son: anclaje a superficies bióticas o abióticas, maduración y dispersión (Muñoz, 2017). Aunque se demostró que la biopelícula de los aislamientos analizados contenía estos tres componentes principales, fueron las proteínas las que se encontraron en mayor medida, con porcentajes de desprendimiento de biopelícula por encima del 80% en todas las especies analizadas al ser tratadas con proteinasa K.

Oniciuc *et al.* (2016) trabajaron con aislamientos de *Staphylococcus* spp., realizando ensayos de producción y composición de biopelícula, encontrando que el componente con

mayor presencia dentro de estas biopelículas correspondía a las proteínas, con porcentajes de desprendimiento desde el 64 al 72%, seguido de los carbohidratos con porcentajes desde el 30 al 50%. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Rodríguez-Lázaro *et al.* (2018), en aislamientos de MRSA, donde los datos de bio-volumen, obtenidos de la cuantificación proteica en las biopelículas de estos aislamientos, fueron mayores incluso que los lípidos y carbohidratos. Sin embargo, se debe tener en cuenta las condiciones experimentales que se llevan a cabo en la formación de biopelícula, ya las condiciones como el medio de cultivo a utilizar suplementado con glucosa o NaCl pueden resultar en variaciones en los índices de formación de biopelícula (Lade *et al.*, 2019).

La formación de biopelícula, además de conferir un ambiente apto para el desarrollo de microorganismo y protección contra el sistema inmunitario del huésped, es capaz de disminuir la actividad de diversos antibióticos. En este trabajo se analizaron las concentraciones MIC, MBIC y MBEC de rifampicina, doxiciclina y moxifloxacino contra *Staphylococcus* spp. Aunque las MIC y MBIC de los tres antibióticos no presentaron diferencia estadísticamente significativa, las MBEC fueron hasta diez veces mayores en relaciones a la dilución utilizada sobre las MIC y las MBIC, sobrepasando el punto de corte sugerido por el CLSI. En un estudio previo, en aislamientos de *Staphylococcus* resistentes a meticilina, las concentraciones de MBEC contra MIC se elevaron hasta 10 veces más en cuanto a la dilución utilizada, traducándose, por ejemplo, en tasas de susceptibilidad de 100% en células planctónicas y del 21% para células de biopelícula, en el caso de rifampicina (Tang *et al.*, 2012). En nuestro trabajo, la comparación de las concentraciones entre aislamientos fuertemente productores y moderadamente productores de biopelícula fue significativamente diferente entre las MBIC de doxiciclina y las MBEC de moxifloxacino. (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2021) demostraron relación entre el nivel de formación de biopelícula y la resistencia antimicrobiana puesto que reportaron que los aislamientos resistentes tendían a producir biopelícula en mayores porcentajes en comparación con aquellos grupos intermedios y susceptibles a antimicrobianos.

## 9. CONCLUSIONES

- Las especies de *Staphylococcus* más frecuentes obtenidos de aislamientos clínicos fueron *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. lugdunensis*.
- Las especies de *Staphylococcus* fueron más comunes en hombres, en las salas hospitalarias de traumatología y COVID, en especímenes respiratorios y tejidos.
- Los aislamientos de *Staphylococcus* spp. presentaron moderada resistencia a oxacilina, levofloxacino, clindamicina y ciprofloxacino, y baja resistencia a daptomicina, gentamicina, tetraciclina, rifampicina, doxiciclina y linezolid, sin resistencia a vancomicina y tigeciclina.
- Las tasas de resistencia a meticilina fueron más frecuentes en *S. haemolyticus*, seguido de *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* y *S. aureus*.
- La producción de biopelícula fue mayor en *S. hominis*, seguido de *S. haemolyticus*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. No se observó producción de biopelícula en *S. lugdunensis*.
- Menos de la mitad de los aislamientos analizados resultaron productores débiles de biopelícula, y en menor proporción se presentó moderada y fuerte producción.
- La composición de la biopelícula fue heterogénea en sus componentes: proteínas, ADN extracelular y carbohidratos.
- Respecto a la susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas (MIC) y de biopelícula (MBIC y MBEC), las MBEC se elevaron hasta 10 diluciones más en comparación con las MBIC.
- El nivel de producción de biopelícula tuvo efecto sobre la actividad de doxiciclina (inhibición) y de moxifloxacino (erradicación), ya que los MBIC y los MBEC difirieron respecto a la producción fuerte y moderada de biopelícula, respectivamente. No se observó efecto de la composición de biopelícula sobre las MBIC y MBEC.
- Los antibióticos lograron la inhibición de biopelículas, pero no su erradicación, lo que indica que estos antibióticos pueden actuar antes de que se formen las biopelículas y no después de su formación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá, L., Simón, M., López-Calleja, A., Ferrer, I., Pereira, J., Ortega, C., Torres, C., Viguera, N., Gómez-Sanz, E., Revillo, M., C Rezusta, A. (2015). Idoneidad del uso del MALDI-TOF MS para la identificación de *Staphylococcus aureus* y miembros del grupo de *Staphylococcus intermedius*. *REDVET*, 1c(1), 1695-7504.
- Aties, L., Moya, G., Mila, M., Figueredo, I., C Brossard, G. (2017). *Staphylococcus aureus* y estafilococo coagulasa negativa resistentes a la meticilina. *MEDISAN*, 21(12), 3300-3305.
- Becker, K., Heilmann, C., C Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Becker, K., Schaumburg, F., Kearns, A., Larsen, A. R., Lindsay, J. A., Skov, R. L., C Westh, H. (2019). Implications of identifying the recently defined members of the *Staphylococcus aureus* complex *S. argenteus* and *S. schweitzeri*: a position paper of members of the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS). *Clinical Microbiology and Infection*, 25(9), 1064-1070. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.028>
- Castellano, M., Perozo, A., C Devis, R. (2016). Resistencia a oxacilina, eritromicina y gentamicina en cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas de hemocultivos. *Kasmera*, 44(2), 97-110.
- Cercenado, E. (2016). Epidemiología de la infección por grampositivos resistentes. *Revista Española de Quimioterapia*, S(1), 6-9. <http://www.seq.es/seq/0214-3429/29/sup1/2cercenado.pdf>
- Cervantes, E., García, R., C Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, c1(1), 28-40. <https://doi.org/10.1108/eb020168>
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., C Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (2015). *Moxifloxacino*. <https://www.aeped.es/comitemedicamentos/pediamecum/moxifloxacino>.

- Fairbrother, R. W. (1940). Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 50(1), 83-88. <https://doi.org/10.1002/path.1700500112>
- Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., Abente, S., Rodas, L., González, P., C de Kaspar, H. M. (2013). *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena de Infectología*, 30(5), 480-488. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>
- Fernández-Rufete, A., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Canteras, M., Ruiz, J., C Gómez, J. (2012). Bacteriemias por *Staphylococcus* coagulasa negativa: Análisis de factores pronóstico e influencia del tratamiento antibiótico. *Revista Española de Quimioterapia*, 25(3), 199-205.
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 430-449. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>
- Frank, K., Del Pozo, J., C Patel, R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis: How daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 111-133. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-07>
- Galarce, N., Muñoz, L., C Jara, M. A. (2016). Detección del gen mecA en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva aisladas desde gatos. *Rev. Chilena Infectol*, 33(4), 410-418.
- García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. del R., C Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa en México. *Biomédica*, 35(3), 513-523. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., C Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(March), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Guzmán-Rodríguez, J. J., Salinas-Pérez, E., León-Galván, F., Barboza-Corona, J. E., Valencia-Posadas, M., Ávila-Ramos, F., Hernández-Marín, J. A., Ramírez-Sáenz, D., C Gutiérrez-Chávez, A. J. (2021). Relationship between antibiotic resistance and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12(4), 1117-1132. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5645>

- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., C Kim, J. S. (2019). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/jcm8111853>
- Lim, D., C Strynadka, N. C. J. (2002). Structural basis for the  $\beta$ -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*, 5(11), 870-876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>
- Llaca-Díaz, J. M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., C Garza-González, E. (2013). One-year surveillance of escape pathogens in an intensive care unit of monterrey, Mexico. *Chemotherapy*, 58(6), 475-481. <https://doi.org/10.1159/000346352>
- López, F., Román, F., Almagro, M., Sanz, N., C Gómez, J. L. (2013). *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes al linezolid: características fenotípicas, genotípicas y sensibilidad a combinaciones de antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(7), 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.10.011>
- Macià, M. D., Rojo-Molinero, E., C Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 20, Issue 10, pp. 981-990). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- Michels, R., Last, K., Becker, S. L., C Papan, C. (2021). Update on coagulase negative staphylococci what the clinician should know. *Microorganisms*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040830>
- Molinos, S., C Giménez, M. (1988). Características clínico-microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus schleiferi* y otros estafilococos coagulasa-negativos. *Control Calidad SEIMC*, 1-4.
- Muñoz, C. (2017). Biopelícula en *Staphylococcus* spp.: estructura, genética y control. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* (Vol. 37, Issue 1).
- Oniciuc, E. A., Cerca, N., C Nicolau, A. I. (2016). Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00390>
- Orozco, M. del R. H. (2016). *Significación clínica y determinantes de patogenicidad de Staphylococcus coagulasa negativos aislados en hemocultivos*.
- Ortega, S., Franco, R., Salazar, B., Rodríguez, S., Cancino, Mario., C Cancino, Juan. (2019). Prevalencia y factores de virulencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos causantes de infección de prótesis articular en un hospital

ortopédico de México. *Cirugía y Cirujanos*, 87(4), 428-435. <https://doi.org/10.24875/ciru.19000690>

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: Mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 18(1), 175-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>

Pasachova, J., Ramirez, S., C Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalities, mechanisms of pathogenicity and cell colonization. *Nova*, 17(32), 25-38.

Peacock, S. J., C Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 577-601. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>

Perez, M. E., Fenoll, R. G., Bayo, S. M., Álvarez, R. M. M., Millán, V. F., Usón, M. C. V., Ruiz, M. P. P., Mainar, J. M. A., Jiménez, M. C. M., C Paesa, C. R. (2022). Impact of *Staphylococcus aureus* bacteremia in COVID-19 patients. *Revista Española de Quimioterapia*, 35(5), 468-474. <https://doi.org/10.37201/req/022.2022>

Picazo, J. J., Betriu, C., Rodríguez-Avial, I., Culebras, E., López, F., C Gómez, M. (2010). Actividad comparativa de la daptomicina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y frente a estafilococos coagulasa negativa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.09.012>

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

Predari, S. C. (2007). Estafilococos coagulasa negativos: El enemigo silente. *Revista Argentina de Microbiología*, 3S(1), 1-3.

Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E. A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., Wagner, M., Barbu, V., Eiros-Bouza, J. M., Nicolau, A. I., C Hernández, M. (2018). Characterization of biofilms formed by foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>

Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., C Bisht, R. (2019). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 5S(1), 3-12. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0757-6>

- Seng, R., Kitti, T., Thummeepak, R., Kongthai, P., Leungtongkam, U., Wannalerdsakun, S., C Sitthisak, S. (2017). Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PLoS ONE*, 12(8), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184172>
- Silva, L. P., Fortaleza, C. M. C. B., Teixeira, N. B., Silva, L. T. P., de Angelis, C. D., C Ribeiro de Souza da Cunha, M. de L. (2022). Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and MRSA in Bedridden Patients and Residents of Long-Term Care Facilities. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111526>
- Soriano, A., Llinares, P., Montejo, M., Salavert, M., Maseda, E., Moreno, A., Pasquau, J., Gómez, J., C Soy, D. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano para *Staphylococcus aureus*. *Sociedad Española de Quimioterapia*, 2c, 1-84. <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
- Tang, H. J., Chen, C. C., Cheng, K. C., Toh, H. S., Su, B. A., Chiang, S. R., Ko, W. C., C Chuang, Y. C. (2012). In vitro efficacy of fosfomicin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, c7(4), 944-950. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr535>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., C Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Urbina-Daza, A., Anaya-Ortega, C., Ahumedo-Monterrosa, M., Gaitan-Ibarra, R., C Anaya-Gil, J. (2019). Estudio teórico de compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad inhibitoria frente a proteína de unión a penicilina (PBP) y resistencia a enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(1), 44-60. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80064>
- Xu, Y., Wang, B., Zhao, H., Wang, X., Rao, L., Ai, W., Yu, J., Guo, Y., Wu, X., Yu, F., C Chen, S. (2021). In Vitro Activity of Vancomycin, Teicoplanin, Linezolid and Daptomycin Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from Chinese Hospitals in 2018-2020. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 5449-5456. <https://doi.org/10.2147/idr.s340623>

Zendejas, G., Avalos, H., C Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Revista Biomed*, 25(3), 129-143.