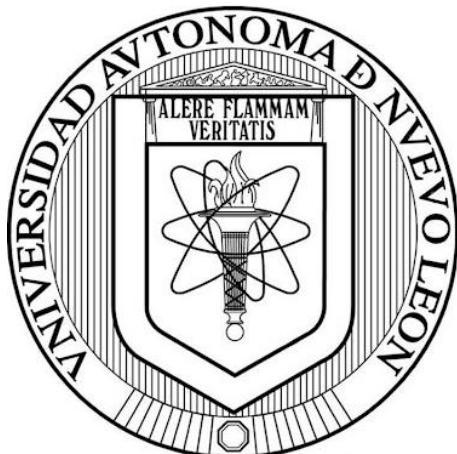


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Prevalencia, perfiles de resistencia e identificación de picos proteicos por
espectrometría de masas como biomarcadores, y activación inmunológica *in vitro*
por biopelículas de bacterias ESKAPE aisladas durante cuatro años de vigilancia
en un hospital de tercer nivel del noreste de México**

por

M.C. ALDO SEBASTIÁN FLORES FLORES

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

2025

Prevalencia, perfiles de resistencia e identificación de picos proteicos por espectrometría de masas como biomarcadores, y activación inmunológica *in vitro* por biopelículas de bacterias ESKAPE aisladas durante cuatro años de vigilancia en un hospital de tercer nivel del noreste de México

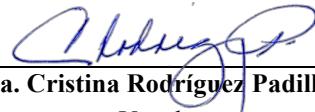
COMITÉ DE TESIS



Dr. José Manuel Vázquez Guillén
Director



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Secretaria



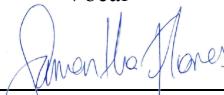
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal



Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Vocal



Dr. Kenny Misael Calvillo Rodríguez
Vocal



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño
Directora Externa



Dra. Kattushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado

Prevalencia, perfiles de resistencia e identificación de picos proteicos por espectrometría de masas como biomarcadores, y activación inmunológica *in vitro* por biopelículas de bacterias ESKAPE aisladas durante cuatro años de vigilancia en un hospital de tercer nivel del noreste de México

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el **Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas** y el **Servicio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”** de la **Facultad de Medicina** de la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, bajo la dirección del **Dr. José Manuel Vázquez Guillén** y la **Dra. Samantha Maribel Flores Treviño**.

DIRECCIÓN DE TESIS



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Director



Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Co-Directora

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.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en:

- El Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.
- El Servicio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

El presente trabajo se realizó gracias a las facilidades prestadas por el **Laboratorio de Inmunología y Virología** de la Facultad de Ciencias Biológicas – UANL.



AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, la Academia Inmunología y todo el personal técnico y administrativo del Laboratorio de Inmunología y Virología por las facilidades proporcionadas para la realización de este proyecto.

Al **Dr. José Manuel Vázquez Guillén** por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto y por la confianza que tuvo en mi para llevar a cabo este proyecto.

Al **Dra. Samantha Maribel Flores Treviño** por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto y por la confianza que tuvo en mi para llevar a cabo este proyecto.

A la **Dra. Ana Carolina Martínez Torres** y el **Dr. Kenny Missael Rodríguez Calvillo** por los consejos y apoyo durante el desarrollo del trabajo de tesis.

A la **Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales** por sus consejos durante en la realización del trabajo de tesis.

A la **M.C. Alondra Yamileth Alanis Valdez** por todo su apoyo durante el desarrollo experimental de proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología, y del Laboratorio de Infectología que me brindaron su apoyo para que este proyecto se lograra desarrollar.

DEDICATORIA

A mis padres, Bernardo Flores Delgado y Blanca Nelly Flores Rivas. Por todo el apoyo que me brindaron en los momentos más difíciles de mi formación académica y por las veces que me apoyaron en las decisiones que tome. Les prometo seguir por el camino que ustedes me han inculcado desde pequeño.

Al Dr. José Manuel Vázquez Guillén, por su amistad, apoyo, consejos y enseñanzas desde el primer día que fui parte del laboratorio. Por todas las oportunidades que me ayudo a conseguir y que gracias a su apoyo fue posible cumplir de la mejor manera.

A Alondra, por todo el apoyo y consejos que me ha dado durante todo este tiempo, y todos los momentos divertidos que hicieron que estos años no fueran tan difíciles.

A Caro, Eli, Roberto, Ilse y Gaby que me han acompañado todo este tiempo, porque siempre me dieron apoyo, consejos cuando más lo necesitaba y me motivaban a ser mejor en lo que hacía.

A Alonso, Fernanda, Roberto, Quiroga, Vale y todos mis compañeros del LIV por todo su apoyo, con ustedes aprendí que durante el trabajo de laboratorio también puede haber diversión, porque las risas hacen que el trabajo sea más sencillo y que no se vuelva algo aburrido.

A Edeer, Rodri, Sam y todos mis compañeros del Laboratorio de Infectología por todo el apoyo que me dieron durante el trabajo experimental y porque en poco tiempo se convirtieron en grandes amigos.

Contenido

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras	ii
Lista de símbolos y abreviaturas	iv
Resumen.....	vi
Abstract	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS).....	3
2.3 IAAS en México	5
2.4 Grupo ESKAPE	5
2.4.1 <i>Enterococcus spp</i>	6
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.4.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.4.4 <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
2.4.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.4.6 <i>Enterobacter cloacae</i>	8
2.5 Resistencia a antibióticos	9
2.5.1 Resistencia a vancomicina	10
2.5.1.1 Mecanismo de acción.....	10
2.5.1.2 Genes relacionados a la resistencia a vancomicina.....	10
2.5.1.3 Adquisición de resistencia a vancomicina	12
2.5.2 Resistencia a meticilina.....	12
2.5.2.1 Mecanismo de acción.....	12
2.5.2.2 Genes relacionados a la resistencia a meticilina	13
2.5.3 Resistencia a carbapenémicos	15
2.5.3.1 Mecanismo de acción.....	15
2.5.3.2 Genes relacionados a la resistencia a carbapenémicos	16
2.6 Producción de biopelícula.....	17
2.6.1 Mecanismo de producción de biopelícula.....	18
2.6.2 Genes relacionados con la producción de biopelícula	18
2.7 Búsqueda de picos biomarcadores en espectros de masas	20
2.8 Respuesta inmune a infecciones bacterianas.....	22
2.8.1 Respuesta inmune a biopelículas bacterianas	23
3 Justificación.....	25
4 Hipótesis.....	26
5 Objetivos	27
6 Material y métodos.....	28

6.1	Descripción del sitio de estudio	28
6.2	Origen e identificación de cepas bacterianas causantes de IAAS	28
6.3	Susceptibilidad antimicrobiana	29
6.4	Producción de biopelícula.....	29
6.4.1	<i>Enterococcus</i> spp.	29
6.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
6.4.3	Clasificación de producción de biopelícula	30
6.5	Identificación de picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula	30
6.6	Determinación de identidad peptídica de picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula	31
6.7	Determinar la respuesta inmune <i>in vitro</i> de PBMC co-cultivadas con biopelícula y células planctónicas.....	31
6.7.1	Obtención de PBMC	32
6.7.2	Co-cultivo de PBMC con biopelícula madura	32
6.7.3	Co-cultivo de PBMC con bacterias planctónicas.....	32
6.7.4	Evaluación de viabilidad y activación celular.....	33
6.7.5	Determinación de citocinas proinflamatorias.....	33
6.8	Analisis estadísticos	34
7	Resultados	35
7.1	Identificación de cepas bacterianas causantes de IAAS	35
7.2	Susceptibilidad a antibióticos de especies bacterianas del grupo ESKAPE	37
7.3	Identificación de picos biomarcadores potenciales para resistencia	38
7.4	Producción de biopelícula en Gram positivas del grupo ESKAPE.....	44
7.5	Picos biomarcadores de farmacorresistencia y producción de biopelícula.....	45
7.6	Identidad peptídica de los picos biomarcadores resistencia y producción de biopelícula	46
7.7	Respuesta inmune <i>in vitro</i> de PBMC co-cultivadas con biopelícula y células planctónicas de Gram positivas del grupo ESKAPE	49
8	Discusión.....	54
9	Conclusiones	63
10	Perspectivas.....	65
11	Bibliografía	66

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de especies bacterianas comparadas para la búsqueda de picos biomarcadores	31
Tabla 2. Concentraciones utilizadas para realizar la curva de estandarización del BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (CBA) - I Kit	33
Tabla 3. Información de procedencia de los aislamientos bacterianos de IAAS de pacientes atendidos entre el 1 de enero de 2019 y el 31 de diciembre de 2022.....	36
Tabla 4. Epidemiología de bacterias ESKAPE	37
Tabla 5. Picos teóricos para el fenotipo resistente de las bacterias ESKAPE.....	40
Tabla 6. Picos teóricos para el fenotipo de producción de biopelícula	45
Tabla 7. Identidad peptídica de biomarcadores potenciales.....	48

Índice de figuras

Figura 1. Localizaciones más comunes de dispositivos médicos que pueden originar una IAAS.	4
Figura 2. Descripción del grupo ESKAPE.....	6
Figura 3. Muertes estimadas en 2050 debido a infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos.....	9
Figura 4. Mecanismo de acción de resistencia a vancomicina.	10
Figura 5. Estructura de los operones van presentes en <i>Enterococcus</i> spp.	11
Figura 6. Genes en el operón vanA que confieren resistencia a vancomicina.	12
Figura 7. Mecanismos de acción en bacterias resistentes a meticilina.	13
Figura 8. Mecanismo de acción de la resistencia a meticilina.	14
Figura 9. Mecanismo de expresión de los genes blaZ y mecA en <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina.....	14
Figura 10. Transferencia horizontal y vertical de resistencia a antibióticos.....	15
Figura 11. Mecanismo de acción de la resistencia a carbapenémicos	16
Figura 12. Principales elementos de transferencia de genes de resistencia en <i>Enterobacteriaceae</i>	17
Figura 13. Ciclo de producción de biopelícula.	18
Figura 14. Operones involucrados en la producción de biopelícula en <i>S. aureus</i>	19
Figura 15. Probable pico biomarcador de 4594 m/z para determinar susceptibilidad a meticilina en <i>S. aureus</i>	20
Figura 16. Probable pico biomarcador de 6590-6599 m/z para determinar susceptibilidad a meticilina en <i>S. aureus</i> . Obtenido de (Yu et al., 2022).	21
Figura 17. Activación de células NK y T en co-cultivos de PBMC con bacterias planctónicas y biopelícula A) <i>P. aeruginosa</i> B) <i>S. epidermidis</i> . Obtenido de Ciornei et al., 2010.....	24
Figura 18. Liberación de citocinas proinflamatorias en co-cultivos de PBMC con bacterias planctónicas y biopelícula. Obtenido de Ciornei et al., 2010	24
Figura 19. Espectro de masas de <i>Enterococcus</i> sp.....	38
Figura 20. Espectro de masas <i>S. aureus</i>	39
Figura 21. Espectro de masas de <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 22. Picos biomarcadores potenciales para susceptibilidad a vancomicina de <i>Enterococcus</i> spp	41
Figura 23. Picos biomarcadores potenciales para susceptibilidad a meticilina de <i>S. aureus</i>	42
Figura 24. Picos biomarcadores potenciales para susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i>	43
Figura 25. Cuantificación de producción de biopelícula mediante tinción con cristal violeta	44

Figura 26. Espectro de masas de especies ESKAPE Gram positivas productoras de biopelículas y no productoras de biopelículas.	45
Figura 27. Análisis de Componentes Principales (ACP) de especies ESKAPE.....	46
Figura 28. Viabilidad de las PBMC en co-cultivo con bacterias planctónicas y la biopelícula producida por A) <i>S. aureus</i> y B) <i>E. faecalis</i>	49
Figura 29. Expresión del marcador de activación temprana CD69 en PBMC estimuladas durante 24 h con bacterias planctónicas y biopelículas maduras de <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i>	50
Figura 30. Liberación de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12P70) en co-cultivos de PBMC con <i>S. aureus</i> en estado planctónico y formando biopelícula madura de 24 h. ANOVA de una vía no paramétrica con prueba de posthoc de Dunns *, p < 0.05; *, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001.....	52
Figura 31. Liberación de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12P70) en co-cultivos de PBMC con <i>E. faecalis</i> en estado planctónico y formando biopelícula madura de 24 h. ANOVA de una vía no paramétrica con prueba de posthoc de Dunns *, p < 0.05; *, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001.....	53

Lista de símbolos y abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ng	Nanogramos
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
μ M	Micro molar
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
°C	Grados Celsius
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
ERV	<i>Enterococcus spp</i> resistentes a vancomicina
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
KPRC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos
ABRC	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes a carbapenémicos
ERC	Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> susceptible a meticilina
ESV	<i>Enterococcus spp</i> susceptible a vancomicina
ABSC	<i>A. baumannii</i> susceptible a carbapenémicos
ESC	Enterobacteriales susceptibles a carbapenémicos
KPRC	<i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos
MDR	Multidrogoresistente
XDR	Ampliamente resistentes a fármacos
PDR	Pan-resistentes a fármacos
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz, por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MS	Espectro de masas, por sus siglas en inglés Mass Espectrum
CVC	Catéteres venosos centrales
OMS	Organización Mundial de la Salud
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
RAM	Resistencia a Antimicrobianos
PBP	Proteína de Unión a Penicilina
MPD	Metaloproteinasa intracelular
CCE	Cromosoma casete estafilocócico
PAI	Polisacárido adhesina intracelular

DO	Densidad óptica
DOc	Densidad optica del control
VPP	Valor Predictivo Positivo
VPN	Valor Predictivo Negativo
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica, por sus siglas, en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells
ITRI	Infecciones del tracto respiratorio inferior
IPTB	Infecciones de piel y tejido blando
ITU	Infecciones del tracto respiratorio
IIA	Infecciones intraabdominales
LCR	Líquido cefalorraquídeo
ABC	Área bajo la curva
ACP	Área bajo la curva
EPP	Equipo de protección personal
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12
TNF	Factor de Necrosis Tumoral, por sus siglas en inglés, Tumor Necrosis Factor.

Resumen

La resistencia antimicrobiana y la formación de biopelícula en infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), causadas principalmente por patógenos del grupo ESKAPE (*Enterococcus* spp. resistente a vancomicina [ERV], *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina [SARM], Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos [ERC], *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos [ABRC] y *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente [MDR]), representan un importante desafío para la salud pública mundial. Este estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de aislamientos del grupo ESKAPE durante cuatro años de vigilancia en un hospital de tercer nivel del noreste de México, y caracterizar su capacidad de formación de biopelícula, su resistencia antimicrobiana e identificación de biomarcadores mediante espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), así como evaluar la respuesta inmune *in vitro* de PBMC humanas frente a biopelículas y formas planctónicas. Se analizaron aislamientos clínicos obtenidos entre 2019 y 2022. La identificación bacteriana se realizó mediante MALDI-TOF MS. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó con el sistema VITEK 2.0, y la formación de biopelículas se evaluó mediante tinción con cristal violeta en cepas Gram positivas seleccionadas. Los picos diferenciales se identificaron comparando espectros de cepas resistentes frente a susceptibles, y productoras frente a no productoras de biopelícula, utilizando los programas MALDI Biotyper y ClinProTools. Para analizar la respuesta inmune, se realizaron co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas con bacterias en su forma planctónica o biopelícula madura. Se evaluaron la viabilidad celular, expresión de CD69 y la producción de citocinas proinflamatorias. Los resultados mostraron que el 49.1 % de los aislamientos resistentes fueron ABRC, seguidos de SARM (22.9 %), *P. aeruginosa* MDR (19.9 %), ERV (4.8 %) y ERC (1.2 %). Se identificaron picos biomarcadores potenciales para resistencia en cepas de ERV (n = 5), SARM (n = 4) y *P. aeruginosa* MDR (n = 4). Las tasas de producción de biopelículas fueron del 40 % para ERV y del 45.8% para SARM; sin embargo, no se identificaron picos específicos relacionados a la producción de biopelícula.

En los ensayos inmunológicos, la biopelícula de SARM indujo una mayor secreción de citocinas en PBMC que su forma planctónica, mientras que en el caso de ERV sólo las formas planctónicas generaron activación celular significativa. En conclusión, el análisis mediante MALDI-TOF MS permitió identificar picos de interés como posibles biomarcadores de resistencia en cepas ESKAPE, y se observó que las biopelículas de SARM pueden inducir una respuesta inmune proinflamatoria distinta a la inducida por sus formas planctónicas.

Abstract

Antimicrobial resistance and biofilm formation in healthcare-associated infections (HAI), primarily caused by ESKAPE pathogens (vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. [VRE], methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA], carbapenem-resistant Enterobacterales [CRE], carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [CRAB], and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [MDR]), represent a growing challenge for global public health. This study aimed to identify potential mass spectrometry peaks as biomarkers associated with antibiotic resistance and biofilm formation, and to evaluate the in vitro immune activation induced by planktonic and biofilm forms of ESKAPE strains isolated from HAI patients in a tertiary care hospital in northeastern Mexico. Clinical isolates collected between 2019 and 2022 were analyzed. Bacterial identification was performed using MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibility was determined using the VITEK 2.0 system, and biofilm formation was assessed in selected Gram-positive strains using crystal violet staining. Differential peak analysis was conducted by comparing mass spectra from resistant versus susceptible strains and biofilm producers versus non-producers, using MALDI Biotyper and ClinProTools software. To evaluate immune response, human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were co-cultured with either planktonic bacteria or mature biofilms. Cell viability, CD69 expression, and proinflammatory cytokine levels were assessed. Among resistant isolates, 49.1% were CRAB, 22.9% MRSA, 19.9 % MDR *P. aeruginosa*, 4.8 % VRE and 1.2 % CRE. Potential biomarker peaks were identified for VRE (n = 5), MRSA (n = 4), and MDR *P. aeruginosa* (n = 4). Biofilm production rates were 40.0% for VRE and 45.8% for MRSA; however, no specific biomarker peaks were associated with biofilm formation. Immunological assays revealed that MRSA biofilms induced higher cytokine secretion in PBMC compared to their planktonic forms. In contrast, only planktonic forms of VRE elicited significant immune activation. In conclusion, proteomic analysis via MALDI-TOF MS enabled the identification of potential resistance-related biomarker peaks in ESKAPE isolates, and demonstrated that MRSA biofilms may trigger a distinct proinflammatory immune response compared to their planktonic counterparts.

1. Introducción

La aparición y el aumento de bacterias resistentes a los antimicrobianos en las infecciones asociadas a la atención médica (IAAS) es un importante problema de salud mundial (Mulani et al., 2019). Las IAAS son causadas principalmente por bacterias diseñadas como patógenos ESKAPE, que incluyen *Enterococcus spp.* resistente a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), Enterobacteriales resistente a los carbapenémicos (ERC), *Acinetobacter baumannii* resistente a los carbapenémicos (ABRC) y *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente (MDR) (Ayobami et al., 2022). Los patógenos ESKAPE también son conocidos por su capacidad de formar biopelículas, que son células bacterianas incrustadas en sustancias poliméricas extracelulares. Las biopelículas presentan un desafío para los tratamientos más comunes, ya que impiden que la mayoría de los antibióticos penetren, lo que aumenta la resistencia bacteriana (Pandey et al., 2021). La espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) es un método que se utiliza de forma rutinaria en la práctica de laboratorio para la identificación rápida y precisa de patógenos bacterianos y fúngicos. Este método se basa en el análisis de proteínas ribosomales, las cuales generan huellas espectrales específicas de especie (Vrioni et al., 2018). Actualmente, se ha propuesto el uso de MALDI-TOF MS para la detección de resistencia a los antimicrobianos, lo que podría facilitar la pronta optimización de la terapia con antibióticos contra infecciones bacterianas (Flores-Treviño et al., 2019; Florio et al., 2020; Vrioni et al., 2018). De manera similar, la determinación de picos de biomarcadores para la producción de biopelículas podría acelerar significativamente la detección de bacterias responsables de infecciones crónicas (Caputo et al., 2018; Florio et al., 2020). Además, debido a la resistencia a antibióticos y la producción de biopelícula puede provocar infecciones crónicas que pueden afectar durante décadas a los pacientes. Se ha investigado lo que sucede con el sistema inmune frente a una infección causada por bacterias planctónicas, sin embargo, el efecto de una infección por una bacteria productora de biopelícula sobre el sistema inmune es poco conocido (Kaya et al., 2021). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue encontrar probables picos

biomarcadores en los espectros de masas generados por MALDI-TOF para determinar la susceptibilidad y producción de biopelícula, y determinar la diferencia del efecto del sistema inmune en contra de bacterias productoras de biopelícula y planctónicas.

2. Antecedentes

2.1 Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)

Las IAAS, también conocidas como infecciones nosocomiales, son aquellas infecciones que aparecen 48 horas después de ingresar en un centro de salud. La adquisición de esta infección es un problema adverso porque puede no estar relacionado con la enfermedad original por la que los pacientes ingresaron a un hospital (Revelas, 2012). En países desarrollados, las IAAS son un problema sanitario debido a que aumenta la morbilidad, la estancia hospitalaria y el costo del tratamiento. Sin embargo, se desconoce el verdadero efecto a nivel debido a que no todos los países poseen un sistema de vigilancia efectivo, esto conlleva a no contar con datos concretos y confiables sobre las IAAS (Ozuna et al., 2019). En Europa, se reportan más de 670,000 IAAS, y aproximadamente 33,000 mueren por consecuencias directas a estas infecciones, mientras que, en Estados Unidos se ha estimado que un millón de personas sufren una infecciones asociadas a la atención de la salud y anualmente se producen 23,000 muertes (Salmanov et al., 2023). De igual manera, se ha dado a conocer que en la Unión Europea se ha reportado que uno de cada cinco pacientes es diagnosticado con una IAAS, y representa un costo de 10,000 euros por paciente, sin embargo, en algunas regiones como en Países Bajos se logró una disminución de la prevalencia y duración media de la estancia hospitalaria, lo que nos demuestra la importancia del impacto de los correctos procedimientos en cuanto a la atención médica (Dadi et al., 2021).

La **Figura 1** indica los sitios más comunes en donde se colocan distintos equipos médicos, algunas infecciones pueden originarse por procedimientos invasivos como colocar catéteres venosos centrales (CVC), catéteres urinarios, dispositivos de acceso vascular, tubos endotraqueales, traqueotomías, tubos de alimentación enteral y drenajes de heridas, etc. De igual forma, puede ser provocado seguido de la colocación de un implante, esto causado por la mala colocación o porque el material estaba contaminado (Dadi et al., 2021).

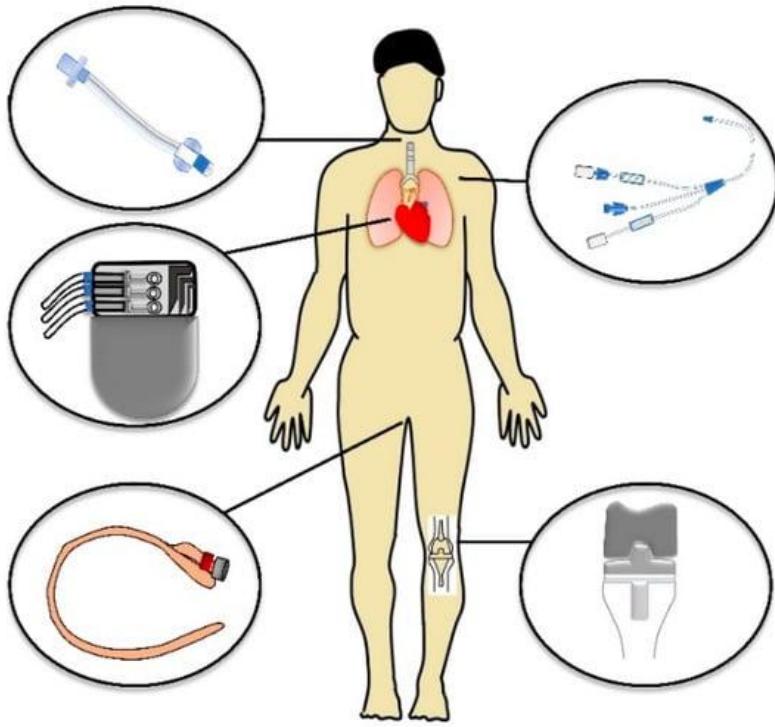


Figura 1. Localizaciones más comunes de dispositivos médicos que pueden originar una IAAS. Obtenido de Dadi et al., 2021

Las IAAS son causadas por distintos organismos como bacterias, hongos o parásitos, siendo las infecciones las más representativas debido al aumento de la resistencia a antimicrobianos o antibióticos, esto incrementa la tasa de mortalidad y de morbilidad, así como también representa una carga para los sistemas de salud e incrementa los costos (Santajit & Indrawattana, 2016).

2.2 Detección de infecciones bacterianas en hospitales

Convencionalmente, la identificación bacteriana a nivel de género se realiza observando características físicas como morfológicas (tamaño y color de colonia), microscopía (tinción Gram), actividad metabólica (pruebas bioquímicas), posteriormente se realizan pruebas para identificar la especie que consisten en una serie de pruebas bioquímicas (Váradi et al., 2017). Además de pruebas microbiológicas, hace más de 3 décadas se comenzó a amplificar el gen ARNr bacteriano 16S para hacer análisis filogenéticos e

identificar bacterias (Church et al., 2020). Recientemente en el área clínica se comenzó a utilizar la espectrometría de masas con desorción por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), esté método genera un espectro de masas (MS) que es comparado con la biblioteca almacenada para así identificar género y especie bacteriana, es más rápido que las pruebas convencionales debido a que solo se necesita el cultivo bacteriano que puede provenir a partir de muestras de sangre, orina, heces, esputo, etc. Además, la metodología se ha adaptado para que se puedan identificar bacterias susceptibles o resistentes a antibióticos, agilizando todo el proceso de identificación bacteriana (Tsuchida & Nakayama, 2022).

2.3 IAAS en México

En México, la información relacionada con IAAS era escasa, la mayoría de los reportes fueron generados en los estados de Jalisco, Ciudad de México y Nuevo León, por esta razón, el gobierno mexicano público un acuerdo de carácter obligatorio llamado “Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos” con el que se buscaba mejorar el uso de antibióticos y reducir la resistencia a antimicrobianos. Al mismo tiempo, se creó la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia que busca divulgar los hallazgos de farmacorresistencia en México (Garza-González et al., 2019).

2.4 Grupo ESKAPE

Las IAAS son causadas frecuentemente por el grupo ESKAPE (**Figura 2**) que incluye a las especies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. Estas bacterias presentan resistencia intrínseca y poseen la capacidad para adquirir resistencia a múltiples fármacos (Ayobami et al., 2022a).

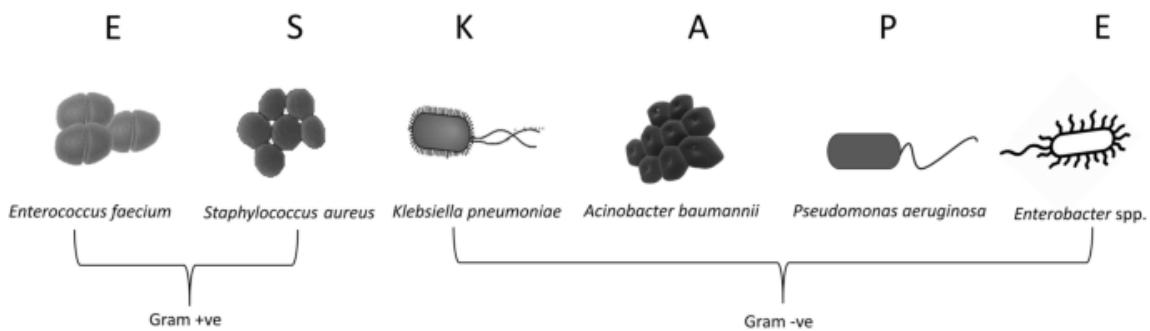


Figura 2. Descripción del grupo ESKAPE. Obtenido de Idris & Nadzir, 2023

2.4.1 *Enterococcus spp*

Los enterococos son bacterias Gram positivas presentes en el intestino humano, las especies más comunes son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Krawczyk et al., 2021). El tratamiento a pacientes con infecciones por *Enterococcus spp.* suele ser un glucopéptido, frecuentemente vancomicina. En la década de 1950, la vancomicina fue aislada de *Amycolaptosis orientalis* y comenzó a utilizarse como una alternativa al uso de penicilina, el uso de este antibiótico alentó el incremento y la propagación de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) (Guffey & Loll, 2021). Sin embargo, en las últimas décadas, las infecciones por ERV han ido en aumento; particularmente por *Enterococcus faecium*, se han reportado infecciones del tracto urinario y respiratorio, aunque estas infecciones afectan principalmente a pacientes inmunosuprimidos (Eichel et al., 2023).

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Los *Staphylococcus aureus* son bacterias Gram positivas, siendo la especie más relevante en el área clínica del género *Staphylococcus*. Es encontrada comúnmente en la microbiota comensal humana de la mucosa nasal, sin embargo, *S. aureus* puede provocar infecciones al acceder a tejidos subyacentes o al torrente sanguíneo cuando existen alteraciones de las barreras cutáneas y de la mucosa (Lee et al., 2018).

En 1960 se reportó por primera vez una infección por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), y para la década de 1990 se había propagado rápidamente. El tratamiento para una infección por SARM dependerá de la parte del cuerpo afectada, debido a que puede causar problemas prácticamente en cualquier parte del cuerpo, además, a pesar de la vigilancia y el desarrollo de nuevos antibióticos sigue siendo un patógeno importante debido a la alta mortalidad (Turner et al., 2019).

2.4.3 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es un patógeno oportunista que causa aproximadamente un tercio de las infecciones por microorganismos Gram negativos, como lo son cistitis, endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del tracto urinario, neumonía y septicemia (Effah et al., 2020). Las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (KPRC) incrementa la tasa de mortalidad de pacientes enfermos y debilitados por la hospitalización en la unidad de cuidados intensivos (UCI), de igual manera los KPCR pueden clasificarse como multidrogoresistentes (MDR), ampliamente resistentes a fármacos (XDR) y pan-resistentes a fármacos (PDR), lo que dificulta el tratamiento de las infecciones (Karampatakis et al., 2023).

2.4.4 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii es un microorganismo Gram negativo causante de diversas infecciones como neumonía adquirida en los hospitales asociadas a respiradores, infecciones del tracto urinario, infecciones gastrointestinales, infecciones en la piel y meningitis bacteriana (Kyriakidis et al., 2021). Es de gran importancia el monitoreo de *A. baumannii* debido a que es responsable de aproximadamente del 2 al 10% de todas las infecciones hospitalarias, esto gracias a que es posible encontrarlo en suelo, agua, alimentos y dispositivos médicos (Gedefie et al., 2021). Las *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos (ABRC) son microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias graves, por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la designó como un patógeno crítico para su investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. En Estados Unidos representa el 2% de todas las IAAS, sin embargo, en Asia

y Medio Oriente alcanza hasta un 20% de los casos en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), además, presenta una alta tasa de mortalidad que oscila entre el 45 a un 70% (Bartal et al., 2022).

2.4.5 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa perteneciente al grupo ESKAPE que causa IAAS, es considerada una bacteria oportunista que causa neumonía asociada al respirador, infecciones en UCI, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas por quemadura, queratitis y otitis media (Tuon et al., 2022). Las infecciones relacionadas a *P. aeruginosa* representan del 7.1 al 7.3% de todas las IAAS, sin embargo, estudios más recientes han reportado que representaban el 16.2% de todas las infecciones y era responsable del 23% de todas las IAAS en la UCI (Reynolds & Kollef, 2021). La OMS catalogó a *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos como prioridad 1 o “crítica” para el desarrollo de nuevos medicamentos, mientras que el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) catalogó a *P. aeruginosa* MDR es una amenaza grave causando 32,600 casos y 2,700 (Kunz Coyne et al., 2022).

2.4.6 *Enterobacter cloacae*

E. cloacae es una bacteria Gram negativa responsable de la mayoría de las infecciones por especies de *Enterobacter* del género *Enterobacteriaceae*, forma parte de la microbiota intestinal y puede causar infecciones como neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel y tejidos blandos e infecciones intravasculares (Ioannou et al., 2021). En 2017, la OMS incluyó a *E. cloacae* resistentes a carbapenémicos (ECRC); que forma parte de los Enterobacteriales Resistentes a Carbapenémicos (ERC), dentro de la lista de patógenos que necesitaba con urgencia el desarrollo de nuevos antibióticos. Antes del 2001 se había reportado que el 99.9% de cepas de pertenecientes a *Enterobacteriaceae* eran susceptibles a carbapenémicos, y para el 2015 existía un 60% de cepas resistentes (Ma et al., 2023).

2.5 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antimicrobianos (RAM) es un proceso natural, sin embargo, el aumento de las cepas resistentes se debe al uso excesivo e irresponsable de antibióticos, además, los factores socioeconómicos como la mala higiene, control deficiente de las infecciones en hospitales y el uso de antibióticos en industria animal y alimentaria se relacionan con el incremento de la resistencia (Mancuso et al., 2021). El uso de antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, y durante las décadas posteriores a la segunda guerra mundial se crearon antibióticos semisintéticos como la amoxicilina y las quinolonas que fueron útiles debido a su estabilidad mejorada y espectros antibacterianos más amplios. Posteriormente, las innovaciones llevaron a crear los macrólidos, cefalosporinas, daptomicina y linezolid (Muteeb et al., 2023). A pesar de los avances en investigación de antibióticos la aparición de bacterias resistentes a aumentado en las últimas décadas, según la OMS en 2019 hubo alrededor de 700,000 muertes relacionadas a bacterias con RAM, y se estima que para el año 2050 esta cifre aumente a 20 millones (Uddin et al., 2021). Además, se estima que en África habría alrededor de 4,150,000 muertes por bacterias RAM y 10 o más muertes por cada 10,000 habitantes, mientras que en América del norte se estiman 317,000 muertes con 5 casos por cada 10,000 habitantes, siendo una de las regiones que serían menos afectados por este (Figura 3) (Sameen et al., 2005).

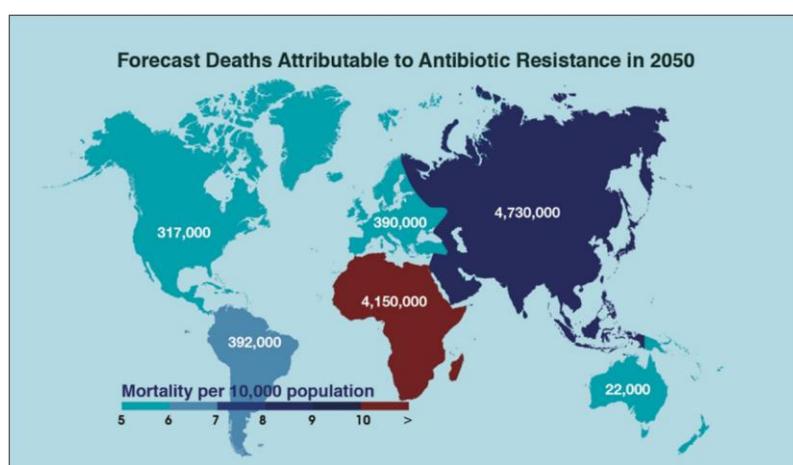


Figura 3. Muertes estimadas en 2050 debido a infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. Obtenida de Sameen et al., 2005.

2.5.1 Resistencia a vancomicina

2.5.1.1 Mecanismo de acción

En la **Figura 4** se muestra el mecanismo de acción de la resistencia a vancomicina. Las bacterias susceptibles a vancomicina expresan monómeros de D-Ala-D-Ala que es identificado por el antibiótico llevando a cabo su mecanismo de acción, mientras que las bacterias resistentes presentan mutaciones que llevan a la expresión de monómeros de D-Ala-D-Lac que son reconocido de forma deficiente por la vancomicina. Al no interaccionar la vancomicina y el monómero D-Ala-D-Lac, la proteína de unión a penicilina (PBP) interacciona con el monómero y forman enlaces de pentaglicina entre los monómeros MurNac-GlaNac lo que conlleva a una división celular continua (Li et al., 2023).

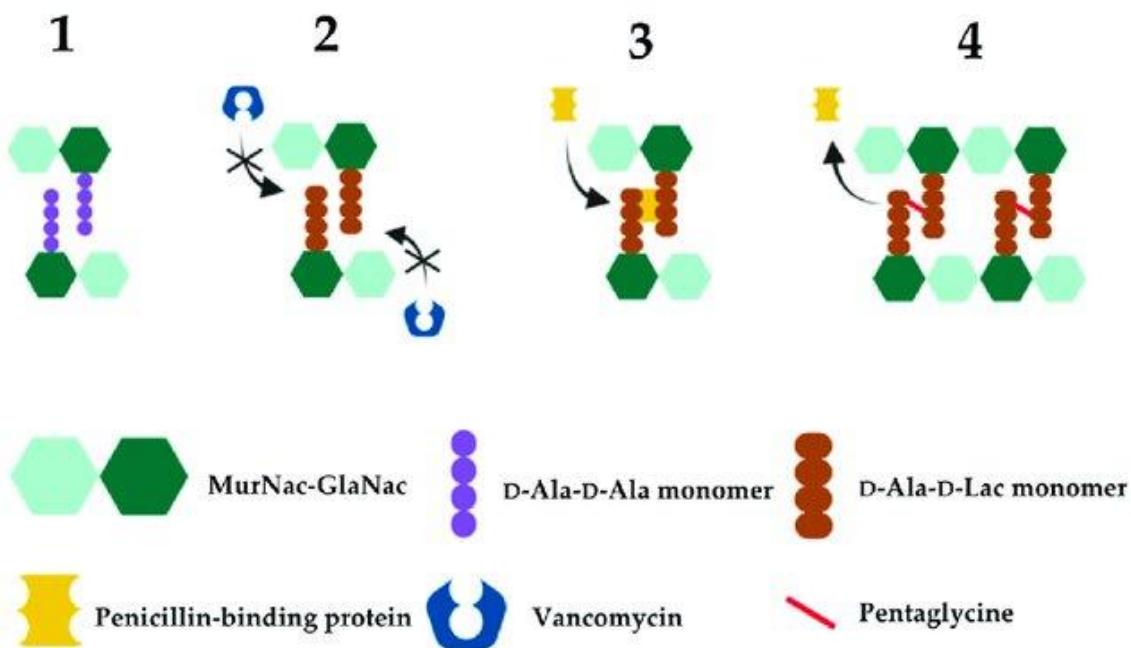


Figura 4. Mecanismo de acción de resistencia a vancomicina. Obtenida de Li et al., 2023

2.5.1.2 Genes relacionados a la resistencia a vancomicina

Los genes responsables a la resistencia a vancomicina se encuentran en el operón Van, actualmente se han descrito al operón vanA, vanB, vanD, vanM, vanG, vanC, vanE y vanL

(**Figura 5**). Todos los operones presentan genes reguladores (**Figura 5, color blanco**) y genes estructurales (**Figura 5, color gris**), sin embargo, la mayoría de las cepas de *Enterococcus spp* presentan el operón vanA y vanB (Marekovic et al., 2024).

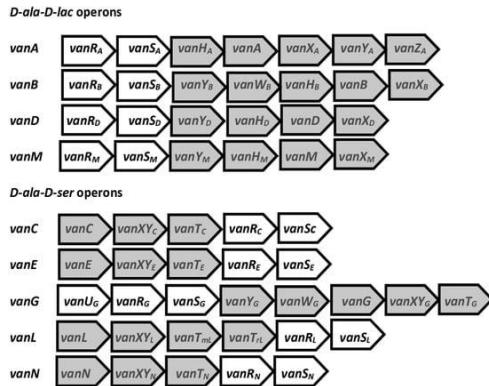


Figura 5. Estructura de los operones van presentes en *Enterococcus spp*. Obtenido de (Marekovic et al., 2024)

Los genes relacionados a la resistencia a vancomicina en *Enterococcus spp* se encuentran en el operón VanA (**Figura 6**) en el que se pueden encontrar 2 componentes, en el primero actúan los genes vanS y vanR que se encargan de responder a la presencia de vancomicina, la interrupción en la membrana celular o ambas. La actividad de vanS-vanR activara los genes río abajo vanH, vanA y vanX; en algunos casos se puede encontrar vanB en lugar de vanA. Cada gen actúa de forma distinta, vanH se encarga de reducir el piruvato a D-Lac, posteriormente, vanX que tiene actividad D-dipeptidasa escinde al monómero D-Ala-D-Ala, esto provoca que exista un D-Ala libre para que vanA/vanB pueda actuar como una ligasa produciendo al monómero D-Ala-D-Lac. El gen vanY (D-carboxipeptidasa) escinde el péptido terminal D-Ala para reducir aún más los grupos de pentapéptidos que tienen alta afinidad por la vancomicina. El gen vanZ se encuentra en todas las cepas portadoras del gen vanA y este va a conferir resistencia a teicoplanina (Faron et al., 2016).

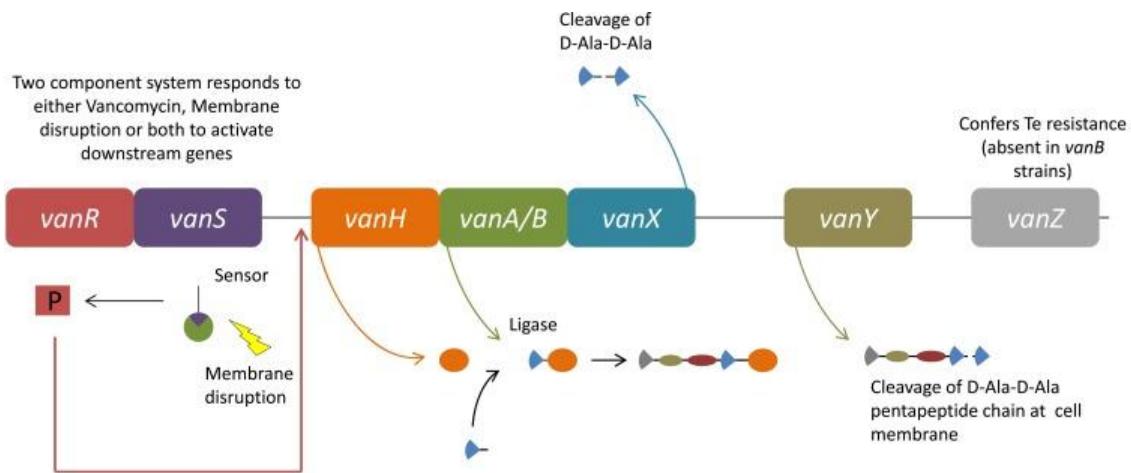


Figura 6. Genes en el operón vanA que confieren resistencia a vancomicina. Obtenido de Faron et al., 2016

2.5.1.3 Adquisición de resistencia a vancomicina

El gen vanA es el más común y el que confiere una mayor resistencia a vancomicina, se ha descrito que se encuentra en el transposón *Tn 1546* que frecuentemente está integrado en un plásmido altamente transferible como los son Inc18, RepA_N y pMG1, por esta razón es que se afirma que la resistencia a vancomicina en *Enterococcus spp* se da por la transferencia de plásmidos conjugativos (Fujiya et al., 2021).

2.5.2 Resistencia a meticilina

2.5.2.1 Mecanismo de acción

Existen diferentes mecanismos por el que una *S. aureus* podría ser resistente a los antibióticos. En el caso de la resistencia a meticilina, el primer mecanismo es que las bacterias pueden producir enzimas que degrada antibióticos; como las β -lactamasa, inhibiendo su actividad del antibiótico sobre la bacteria. Mientras que el segundo mecanismo planteado, es que se pueden generar proteínas de unión a penicilina PBP2a que poseerán una forma alternativa de unión al antibiótico llevándolo a una afinidad reducida (Murphy & Wallshe, 2011).

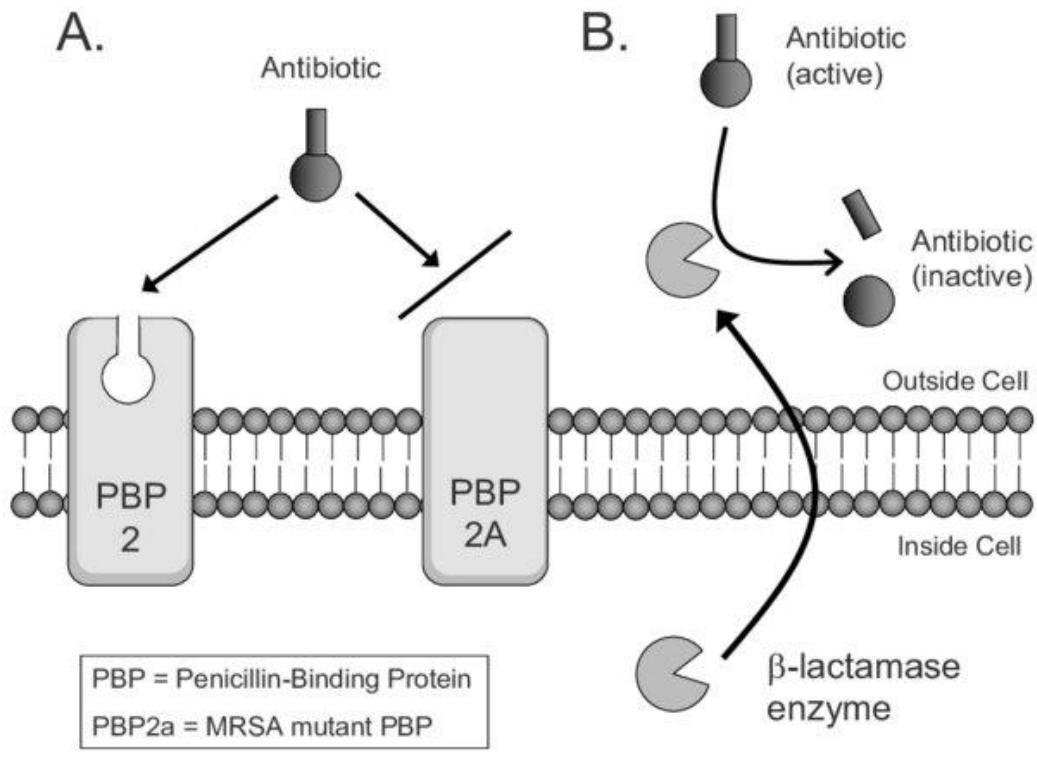


Figura 7. Mecanismos de acción en bacterias resistentes a meticilina. Obtenido de Murphy & Wallshe, 2011

2.5.2.2 Genes relacionados a la resistencia a meticilina

En la **Figura 8** se observa el mecanismo de acción del gen *mecA* en las bacterias resistentes a meticilina, en ausencia de antibióticos β -lactámicos, la transactivación del regulador *mecA* se encuentra reprimida, mientras que al estar en presencia de antibióticos β -lactámicos son detectados por su interacción con el dominio de unión a penicilina (PBP), esta reacción desencadena la activación autolítica del dominio de metaloproteinasa intracelular (MPD) de *mecR1*. Los fragmentos de la pared celular citoplasmática actúan como coactivador para que se unan a *mecI*, esto interrumpe su asociación con el operador *mec* y promueve su degradación proteolítica. Posteriormente *mecR2* se transcribe en presencia de β -lactámicas y produce a la proteína *mecR2* que se une a *mecI* provocando

su proteólisis. La degradación de *mecI* conlleva a la transcripción de *mecA* y produciendo la proteína PBP2a que confiere la resistencia a meticilina (Peacock & Paterson, 2015).

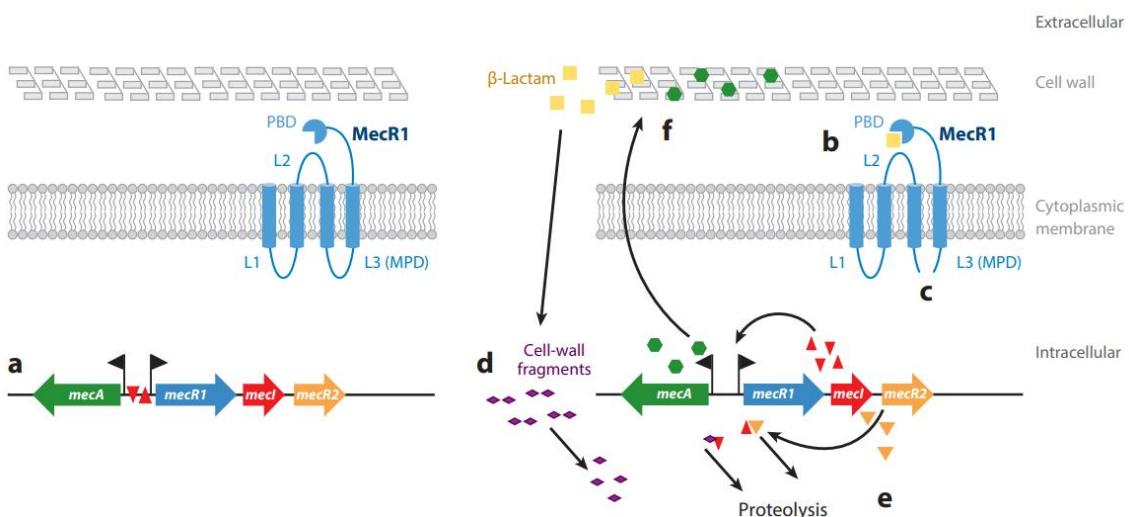


Figura 8. Mecanismo de acción de la resistencia a meticilina. Obtenida de Peacock & Paterson, 2015

Además del gen *mecA*, la regulación del gen *blaZ* (Figura 9) al ser detectado un antibiótico β-lactámico induce la escisión del represor transcripcional citoplasmático *blaI*, esto lleva como resultado final la expresión del gen *blaZ*; que codifica a la proteína *blaZ*, y la bacteria presentara resistencia a meticilina (Lade & Kim, 2023).

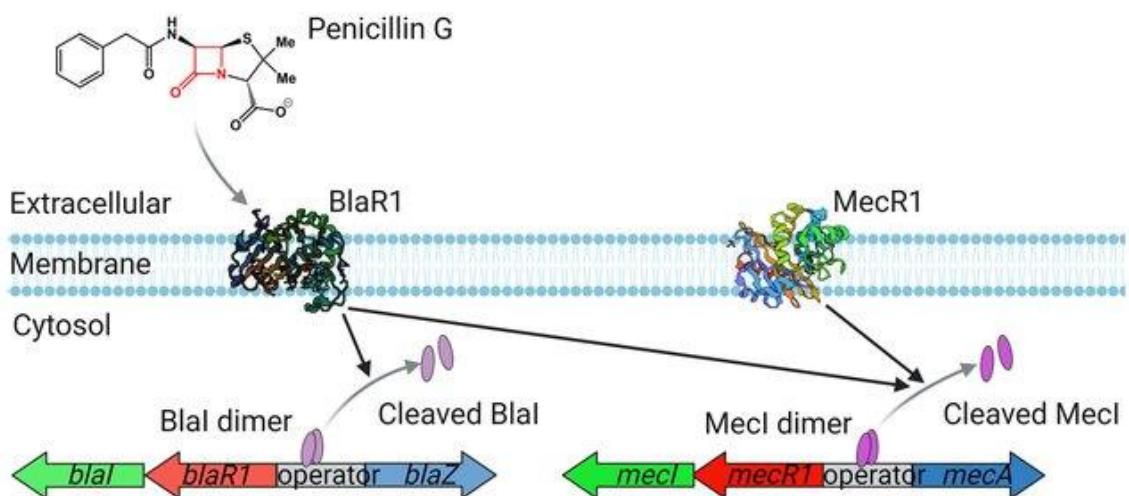


Figura 9. Mecanismo de expresión de los genes *blaZ* y *mecA* en *S. aureus* resistentes a meticilina.

Obtenido de Lade & Kim, 2023

2.5.2.3 Adquisición de la resistencia a meticilina

El gen blaZ se encuentra integrado en el cromosoma, o en plásmidos en las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, las cepas que poseen el plásmido con el gen blaZ tienen la capacidad de transferir (**Figura 10**) el plásmido a una cepa de *S. aureus* susceptible a meticilina adquiriendo la resistencia al antibiótico (Olsen et al., 2006). Mientras que, el gen mecA está presente en el cromosoma casete estafilocócico (CCE) de las cepas SARM, un elemento móvil que puede ser transferido por transducción o conjugación a una cepa de SASM adquiriendo la resistencia a meticilina (Maree et al., 2022).

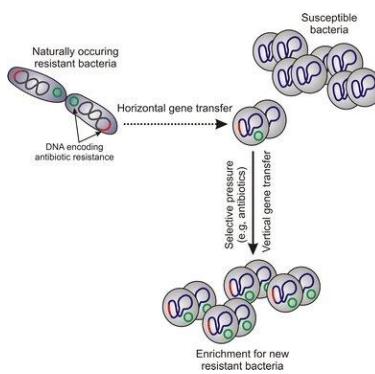


Figura 10. Transferencia horizontal y vertical de resistencia a antibióticos. Obtenido de Malachowa & Deleo, 2010

2.5.3 Resistencia a carbapenémicos

2.5.3.1 Mecanismo de acción

Las carbapenemasas se encuentran principalmente en bacterias Gram negativas; como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *E. cloacae*, y se encargan de inhibir la mayoría de los antibióticos β -lactámicos otorgándoles la resistencia a dicho antibiótico (**Figura 11**). Un mecanismo de acción puede ser por 2 formas, el primero es que algunas bacterias presentan proteínas de poro reducidas que no dejan ingresar los carbapenémicos a la bacteria y que puedan interactuar con PBP para iniciar el mecanismo de acción del antibiótico, mientras que el segundo mecanismo es que la bacteria genera carbapenemasas que interactúan con los antibióticos carbapenémicos escindiéndolos, o por el cambio

estructural de PBP modificando su actividad y evitando la unión con los carbapenémicos (Ma et al., 2023).

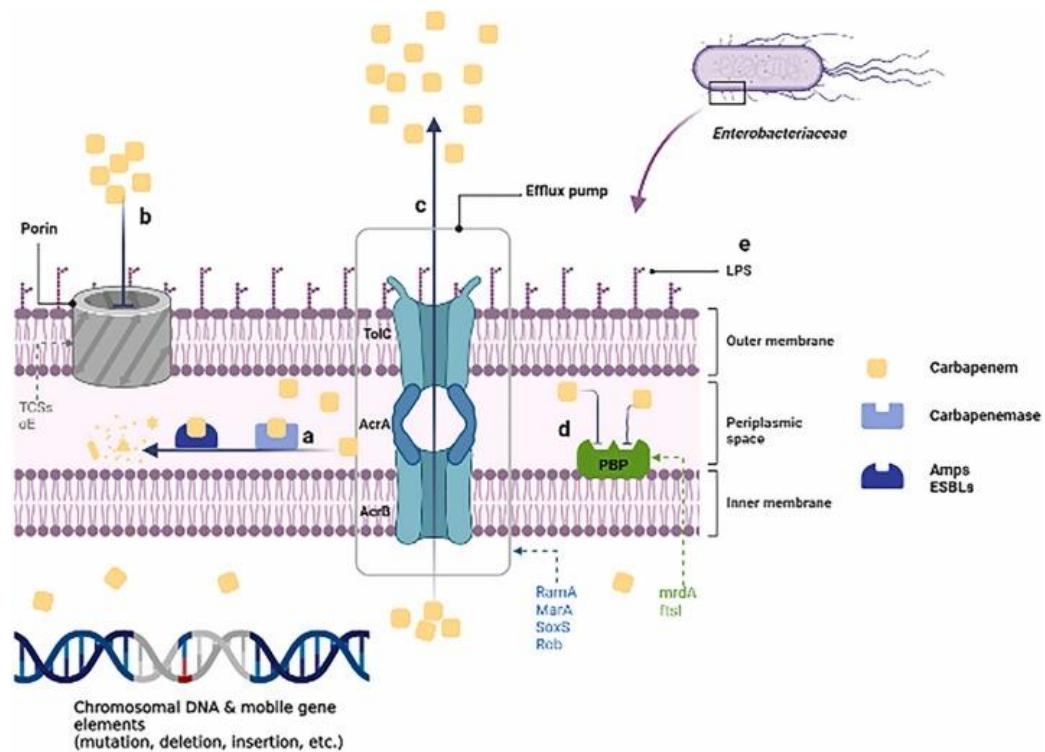


Figura 11. Mecanismo de acción de la resistencia a carbapenémicos. Obtenido de Ma et al., 2023

2.5.3.2 Genes relacionados a la resistencia a carbapenémicos

En los microorganismos *Enterobacteriaceae* existen una gran cantidad de genes involucrados en la resistencia a carbapenémicos y se han categorizado en diferentes familias. La clase Ambler (tipos KPC, SME, IMI, NMC, GES), metalo-β-lactamasas de clase B (tipos VIM, IMP, GIM, SMP y NDM), la clase C que integra enzimas codificadas por el cromosoma bacteriano y β-lactamasas de clase D (OXA-48) (Tuhamize & Bazira, 2024).

2.5.3.3 Adquisición de la resistencia a carbapenémicos

En los *Enterobacteriaceae* se han reportado distintos elementos con la capacidad de transferir los genes relacionados a la resistencia a carbapenémicos. En la **Figura 12** están representados los elementos más frecuentes, el transposón Tn4401 lleva el gen blaKPB-2, el gen blaNDM-1 se encuentra delimitado por una secuencia de inserción (ISAb125) y por el gen bleMBL (resistencia a bleomicina), el integrón de clase 1 (intI1) posee el gen blaVIM-2, el transposón Tn1999 alberga al gen blaOXA48 y el transposón Tn2013 está asociado al gen blaOXA-181. Todos estos elementos pueden ser transferidos de una cepa de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos a una bacteria *Enterobacteriaceae* susceptible resistente a carbapenémicos (Nordmann et al., 2012).

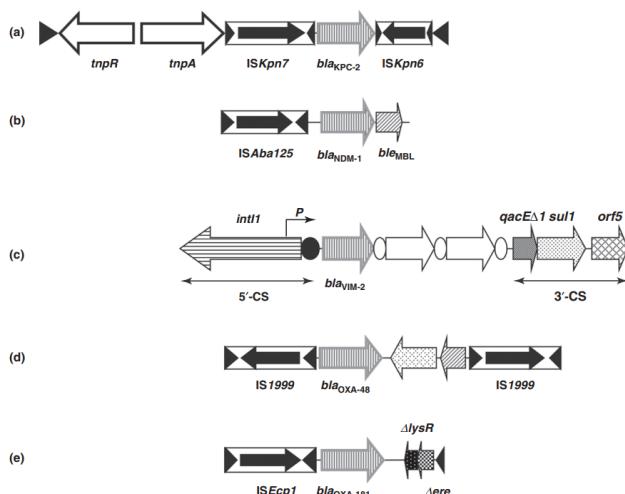


Figura 12. Principales elementos de transferencia de genes de resistencia en *Enterobacteriaceae*.

Obtenido de (Nordmann et al., 2012)

2.6 Producción de biopelícula

La biopelícula fue descubierta en 1683, cuando Antoni van Leeuwenhoek la describió, sin embargo, no fue hasta la década de 1970 que comenzó a producir interés médico (Høiby, 2017). La biopelícula es un grupo de bacterias adheridas o incrustadas en una matriz autoproducida, esta matriz está compuesta por proteínas (fibrina), polisacáridos (alginato) y ADN ambiental. Esta matriz ofrece protección otorgando distintas estrategias de supervivencia como permanecer latentes y ocultas del sistema inmunológico, gracias a

esto son capaces de generar daño local y finalmente provocar una infección aguda (Vestby et al., 2020). La bacteria se vuelve capaz de sobrevivir a la anoxia ambiental y limitación de nutrientes, esto lo lleva a presentar una tasa metabólica más baja, y una alteración en la producción génica y de proteínas (Donlan & Costerton, 2002).

2.6.1 Mecanismo de producción de biopelícula

El proceso de producción de biopelícula (**Figura 13**) inicia con las células planctónicas se unen a una superficie sólida, esta bacteria se denomina célula planctónica recién adherida o biopelícula colocada. Posterior a esta unión, comienza a madurar la biopelícula en donde las células bacterianas se rodean de una matriz extracelular producida por las mismas bacterias. A partir de la biopelícula madura ocurren 2 procesos, uno en donde se pueden dispersar células bacterianas individuales (fenotipo recién disperso) o la segregación de agregados de biopelícula desprendido (fenotipo de biopelícula), en ambos casos (células individuales o agregados de biopelícula) pueden comenzar de nuevo el proceso de maduración al unirse a una superficie (Cerone & Marsili, 2021).

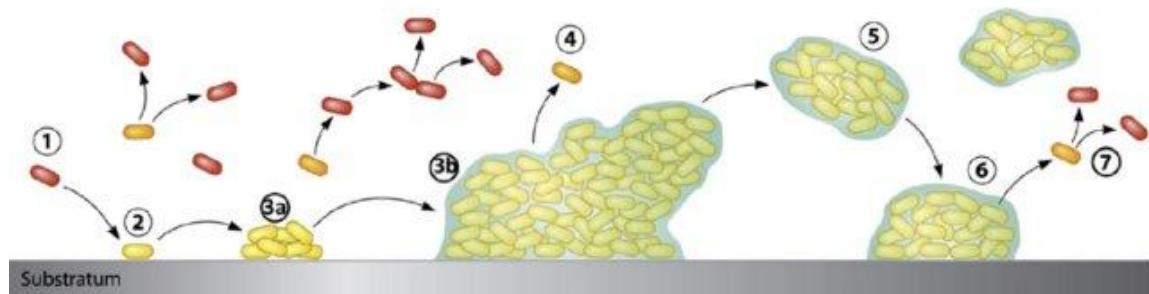


Figura 13. Ciclo de producción de biopelícula. Obtenido de Cerone & Marsili, 2021

2.6.2 Genes relacionados con la producción de biopelícula

Los genes responsables en la producción de la biopelícula en cada microorganismo son distintos, un ejemplo claro son los operones responsables de esta actividad en *S. aureus*. Son 5 los operones principales (**Figura 14**), en donde el encargado de producir el polisacárido adhesina intercelular (PAI) es el operón icaADBC, se ha observado que el 100% de los aislados clínicos de *S. aureus* poseen dicho operón y se correlaciona como

un elemento esencial para producción de biopelícula. El operón dltABCD programa la síntesis de ácidos teicoicos de la pared unidos a peptidoglicanos con la liberación de cuatro proteínas funcionales responsables de la esterificación de los ácidos teicoicos con D-alanina. La regulación de la actividad de la mureína hidrolasa se ve favorecida por el operón cid, que actúa como efector al codificar proteínas similares a la holina. Se han estudiado mutantes cidA (mutante con lisis defectuosa) que mostraron células poco compactadas con menor adherencia en sistemas de biopelículas tanto estáticos como de células de flujo. La función de PSM-b sobre la maduración de la biopelícula se observó en una cepa de *S. epidermidis* mutante, esta bacteria expresó una biopelícula densa y extendida en sistemas de células de flujo en comparación con su tipo salvaje, esto sugirió que PSM-b favorece el desprendimiento de la biopelícula al alterar las interacciones moleculares. Por último, se ha descrito que el operón Agr puede regular negativamente la expresión de componentes de la superficie que reconocen moléculas de matriz adhesiva que tienen un impacto en la iniciación de la producción de biopelícula (Halebeedu et al., 2014).

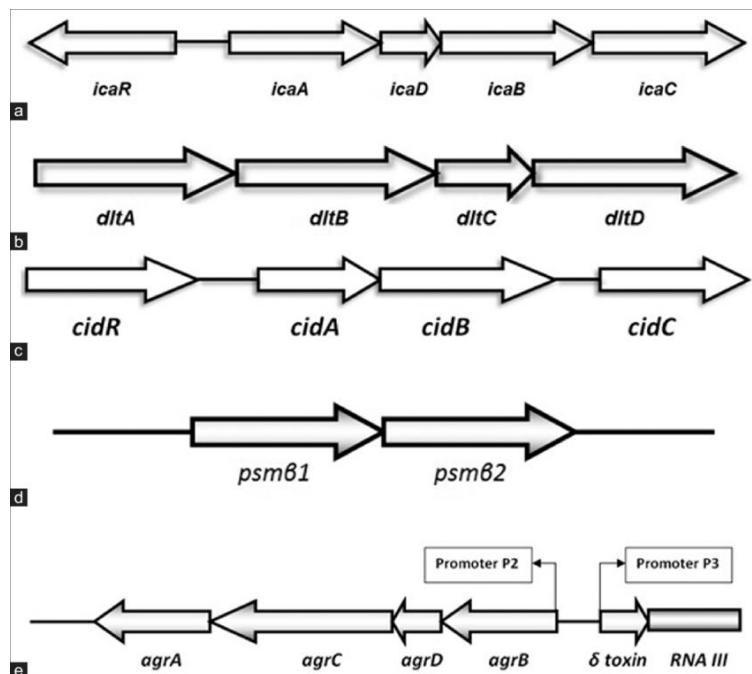


Figura 14. Operones involucrados en la producción de biopelícula en *S. aureus*. Obtenido de Halebeedu et al., 2014

2.7 Búsqueda de picos biomarcadores en espectros de masas

MALDI-TOF MS es un método que se utiliza rutinariamente en la práctica de laboratorio para la identificación rápida y precisa de patógenos bacterianos y fúngicos. Este método se basa en el análisis de proteínas ribosomales, que generan huellas espectrales específicas de especie (Vrioni et al., 2018). Actualmente, se ha propuesto el uso de MALDI-TOF MS para la detección de resistencia a los antimicrobianos, lo que podría facilitar la optimización rápida de la terapia con antibióticos contra infecciones bacterianas (Flores-Treviño et al., 2019; Florio et al., 2020; Vrioni et al., 2018). De manera similar, la determinación de picos de biomarcadores para la producción de biopelículas podría acelerar significativamente la detección de bacterias responsables de infecciones crónicas (Caputo et al., 2018; Florio et al., 2020).

Flores-Treviño y colaboradores determinaron la presencia de posibles picos biomarcadores para determinar si una sepa de *S. aureus* era resistente o susceptible a meticilina, en la **Figura 15** determinando un pico de 4,594 m/z presente en las sepas susceptibles (Flores-Treviño et al., 2019).

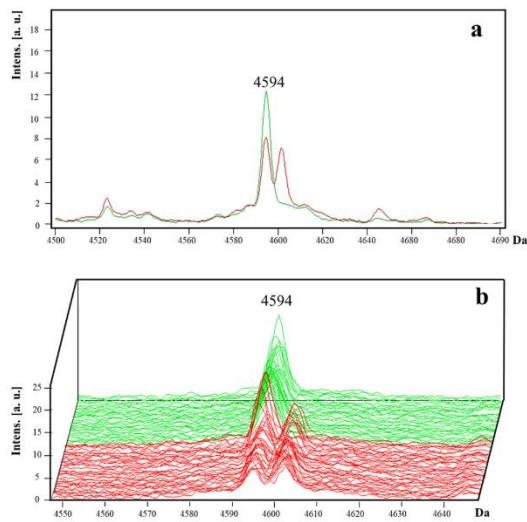


Figura 15. Probable pico biomarcador de 4594 m/z para determinar susceptibilidad a meticilina en *S. aureus*. Obtenido de Flores-Treviño et al., 2019

Otros estudios han determinado picos de distintos tamaños, como lo reportado por Yu y colaboradores, ellos encontraron que existía un pico de 6590-6599 m/z (**Figura 16**) presente solamente en las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (Yu et al., 2022), todos los hallazgos relacionados con picos biomarcadores a resistencia servirán para agilizar el diagnóstico clínico, sin embargo, esto no podría sustituir a las pruebas de susceptibilidad realizadas convencionalmente.

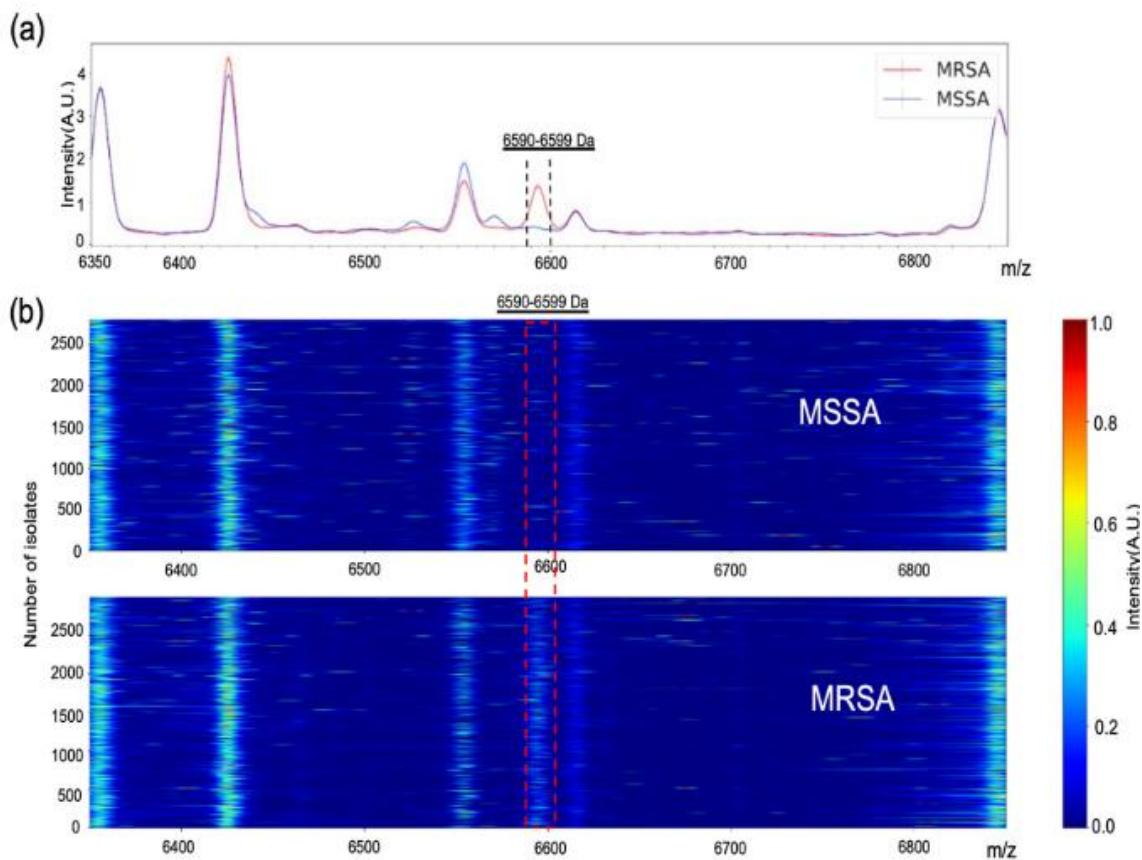


Figura 16. Probable pico biomarcador de 6590-6599 m/z para determinar susceptibilidad a meticilina en *S. aureus*. Obtenido de (Yu et al., 2022).

Determinar si una cepa será productora de biopelícula débil, modera o fuerte utilizando los espectros de masas es muy complicado, actualmente, los enfoques metodológicos utilizados para identificar la producción de biopelículas basados en el perfil de

espectroscopia MALDI-TOF varían entre cada grupo de estudio. Algunos estudios utilizan condiciones y materiales específicos de crecimiento de biopelículas y comparan la espectroscopia de células planctónicas, lo que permite distinguir con éxito entre diferentes etapas de biopelículas (Pereira et al., 2015).

2.8 Respuesta inmune a infecciones bacterianas

Se ha descrito el funcionamiento del sistema inmune en contra de infecciones bacterianas, sin embargo, gran cantidad de esta información está enfocada al estado planctónico de la bacteria.

El sistema inmune innato actúa como la primera línea de defensa a infecciones bacterianas, en ella actúan los monocitos sanguíneos, macrófagos tisulares, células dendríticas (CD), células NK y T. Estas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de las bacterias, estos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como receptores tipo toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores desencadenantes expresados en células mieloides (TREM) y receptores tipo RIG (RLR). Cada uno de ellos es capaz de reconocer distintos elementos bacterianos como LPS o ADN (Giamarellos-Bourboulis & Raftogiannis, 2012).

La respuesta inmune adaptativa a infecciones bacterianas comienza en el momento que las CD y monocitos actúan como células presentadoras de antígeno (Giamarellos-Bourboulis & Raftogiannis, 2012), lo anterior facilitaría que la diferenciación de Th0:

- **Th1:** Promueven la fagocitosis bacteriana al secretar factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferón- γ (INF- γ) y promover una respuesta proinflamatoria.
- **Th2:** Estimulan una respuesta antiinflamatoria al secretar interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10).
- **Th17:** Comienzan a secretar interleucina-17 (IL-17) para iniciar la fagocitosis bacteriana.
- **Treg:** Estimulan respuestas antiinflamatorias.

2.8.1 Respuesta inmune a biopelículas bacterianas

Las bacterias formadoras de biopelícula están involucradas en las infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos como catéteres intravasculares, catéteres urinarios, implantes protésicos, entre otros (Tolker-Nielsen, 2014). Las bacterias formadoras de biopelícula frecuentemente provocan infecciones crónicas que pueden persistir durante décadas, sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la respuesta inmune humana contra bacterias en estado planctónico (Moser et al., 2017).

Recientemente, se investigaron las diferencias de la activación del sistema inmune humano frente a bacterias en estado planctónico comparado con biopelícula bacteriana. Los primeros fueron evaluando la respuesta de neutrófilos y monocitos frente a biopelícula, se reportó que *P. aeruginosa* productora de biopelícula inducía una mayor producción del TNF- α y IL-6 (Ciornei et al., 2010).

Actualmente, se ha investigó el efecto sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se ha observado que la viabilidad no tenía una diferencia significativa comparando co-cultivos de PBMC con bacterias planctónicas y PBMC con bacterias formadoras de biopelícula, sin embargo, si se observó una mayor activaciones de células T y NK en los co-cultivos con bacterias formadoras de biopelícula (**Figura 17**), además, observaron que la secreción de citocinas era diferente retando las PBMC con bacterias planctónicas comparada con bacterias formadoras de biopelícula, sin embargo, eso dependerá de la especie bacteriana (**Figura 18**). En el caso de *P. aeruginosa* se observó un aumento de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6, IL-10 así como interleucina-8 (IL-8), e interleucina-1 β (IL-1 β), mientras que en *S. epidermidis* se observó una disminución de las mismas citocinas proinflamatorias (Kaya et al., 2020, 2021).

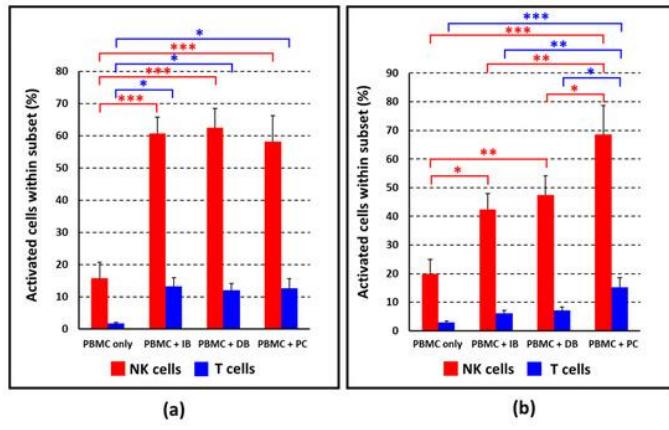


Figura 17. Activación de células NK y T en co-cultivos de PBMC con bacterias planctónicas y biopelícula **A)** *P. aeruginosa* **B)** *S. epidermidis*. Obtenido de Ciornei et al., 2010

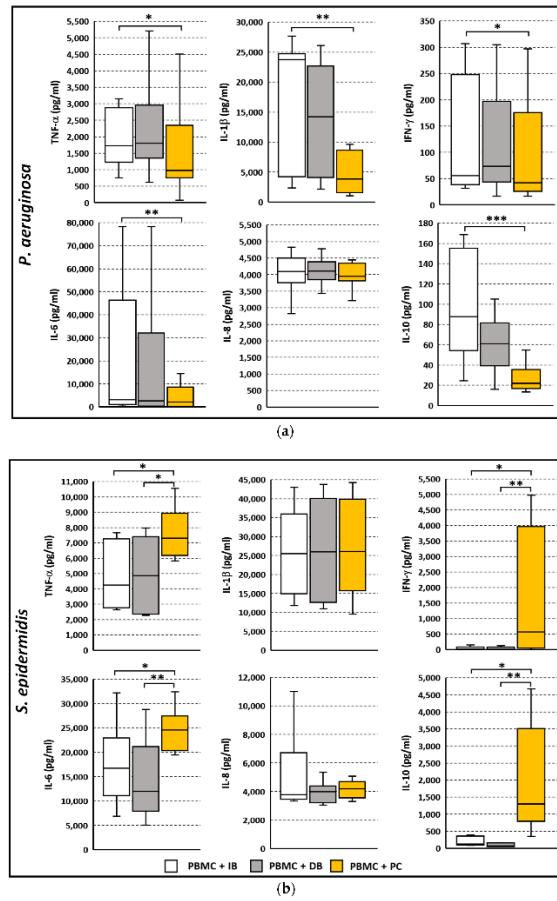


Figura 18. Liberación de citocinas proinflamatorias en co-cultivos de PBMC con bacterias planctónicas y biopelícula. Obtenido de Ciornei et al., 2010

3 Justificación

Anualmente, alrededor de 1.7 millones de pacientes hospitalizados adquieren una IAAS y más de 98,000 mueren a causa de estas infecciones. Las IAAS son consideradas una seria preocupación tanto para los profesionales de la salud como para los pacientes, debido al aumento en su morbilidad, mortalidad y costos asociados a estancias hospitalarias prolongadas. Los principales agentes causales de las IAAS son las bacterias del grupo ESKAPE, conocidas por su elevada resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados y por su capacidad para formar biopelículas. Estas estructuras proporcionan una barrera física y funcional que protege a las bacterias frente a la respuesta inmune del huésped y los tratamientos antimicrobianos, favoreciendo la persistencia de la infección y la aparición de cepas MDR. Ante este panorama, se requieren estudios que profundicen en la caracterización de los patógenos ESKAPE, con el fin de comprender mejor sus mecanismos de resistencia y patogenicidad, así como para desarrollar estrategias más efectivas de prevención, diagnóstico y tratamiento.

4 Hipótesis

Los aislamientos del grupo ESKAPE obtenidos durante cuatro años de vigilancia en un hospital de tercer nivel del noreste de México presentan una alta prevalencia y una elevada capacidad de formación de biopelícula; además, los picos generados por MALDI-TOF MS son biomarcadores potenciales de resistencia antimicrobiana y formación de biopelícula, y sus formas planctónicas y de biopelícula inducen una activación diferencial de la respuesta inmune *in vitro* en PBMC humanas.

5 Objetivos

Objetivo general

Determinar la prevalencia de aislamientos bacterianos del grupo ESKAPE obtenidos durante cuatro años de vigilancia en un hospital de tercer nivel del noreste de México, y caracterizar su capacidad de formación de biopelícula, su resistencia antimicrobiana e identificación de biomarcadores mediante MALDI-TOF MS, así como evaluar la respuesta inmune *in vitro* de PBMC humanas frente a biopelículas y formas planctónicas.

Objetivos específicos

1. Determinar la prevalencia de patógenos del grupo ESKAPE en aislamientos clínicos obtenidos durante cuatro años de vigilancia (2019-2022) en un hospital de tercer nivel de atención del noreste de México.
2. Evaluar la capacidad de formación de biopelícula de los aislamientos clínicos del grupo ESKAPE.
3. Identificar picos biomarcadores potenciales asociados a la resistencia antimicrobiana y a la producción de biopelícula en cepas ESKAPE a partir de análisis de MALDI-TOF MS y herramientas bioinformáticas.
4. Determinar la identidad proteica de los picos asociados a la resistencia antimicrobiana y a la producción de biopelícula mediante análisis peptídico *in silico*.
5. Evaluar la respuesta inmune *in vitro* de PBMC humanas frente a biopelículas y formas planctónicas de aislamientos clínicos del grupo ESKAPE.

6 Material y métodos

6.1 Descripción del sitio de estudio

El Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina de la UANL es un centro médico de alta especialidad que combina la atención médica de tercer nivel con la formación de profesionales de la salud y el desarrollo de investigación biomédica. Ubicado en Monterrey, Nuevo León, este hospital cuenta con dos áreas hospitalarias independientes que brindan atención a la región noreste de México. El edificio principal recibe pacientes adultos y pediátricos en 20 salas, con una capacidad actual de 600 camas destinadas al tratamiento de enfermedades no relacionadas con el coronavirus 2019 (COVID-19). El segundo edificio cuenta con 85 camas, las cuales fueron destinadas al diagnóstico y tratamiento de casos sospechosos o confirmados de COVID-19 durante la pandemia. El hospital recibe referencias de hospitales públicos y privados, y atiende a una población proveniente del área metropolitana de Monterrey (aproximadamente 5 millones de habitantes) y estados vecinos. Se reporta un promedio anual de 25,000 admisiones y alrededor de 200,000 visitas al servicio de urgencias.

6.2 Origen e identificación de cepas bacterianas causantes de IAAS

Los aislamientos bacterianos de IAAS se obtuvieron de pacientes atendidos entre el 1 de enero de 2019 y el 31 de diciembre de 2022. Este estudio fue aprobado por los comités de Ética en Investigación, Investigación y Bioseguridad del Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González” con el registro IF23-00004. No se requirió consentimiento informado ya que se utilizaron especímenes almacenados en el banco de cepas del hospital. La información clínica relacionada con la procedencia de los aislamientos fue recabada mediante revisión de la base de datos del Servicio de Infectología, bajo condiciones estrictas de confidencialidad y anonimización de los datos personales de los pacientes.

La identificación bacteriana se realizó mediante MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los

aislados se cultivaron en placas de agar sangre e incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, una colonia se transfirió a una placa de acero inoxidable de 96 pocillos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y se le añadió 1 µL de ácido fórmico al 70 % y 1 µL de solución matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, Toluca, México). La placa se analizó mediante el software MALDI Biotyper 3.0, comparando los espectros con la base de datos de perfiles espectrales. Se utilizó la siguiente escala para la identificación: puntuaciones entre 2,000 y 2,299 indicaron una identificación confiable a nivel de género, y de 2,300 a 3,000 a nivel de especie.

6.3 Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó con el sistema VYTEK 2.0 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La selección de antibióticos y puntos de corte se realizó de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute de 2023 (CLSI, 2023). Las cepas se clasificaron como multirresistentes cuando presentaron resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp., meticilina en *Staphylococcus aureus*, carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriales*, y resistencia a tres o más clases de antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*.

6.4 Producción de biopelícula

Se utilizó el método de microplaca con tinción con cristal violeta, estandarizado por especie bacteriana, ajustando la concentración de glucosa y el agente solubilizador (alcohol-acetona 70:30 o ácido acético).

6.4.1 *Enterococcus* spp.

Los aislamientos se cultivaron en agar sangre e incubaron por 24 h a 35-37 °C. Posteriormente, se resembraron en agar soya tripticaseína (TSA) y se incubaron nuevamente por 24 h a 35-37 °C. El inóculo se ajustó a una turbidez de 1.0 en la escala de McFarland y se diluyó 1:100 en caldo soya tripticaseína (TSB) suplementado con 1.0% de glucosa. En placa de microtitulación se añadieron 200 µL de la dilución. Se incluyeron

controles positivos (*E. faecalis* ATCC 29212 y ATCC 51299), negativos (*S. hominis* ATCC 27844) y un control con TSB estéril. La placa se incubó por 24 h a 35-37 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 200 µL de agua estéril. La biopelícula se fijó con metanol, se tiñó con 100 µL de cristal violeta 0.5% durante 5 min, se realizaron tres lavados con 200 µL de agua estéril y se solubilizó con 150 µL de alcohol-acetona 70:30. La absorbancia se midió a 595 nm (DO₅₉₅) en un espectrofotómetro (iMark, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, Estados Unidos).

6.4.2 *Staphylococcus aureus*

El procedimiento fue similar al descrito para *Enterococcus* spp., utilizando TSB suplementado con 0.5% de glucosa. Como control positivo se empleó *S. aureus* ATCC 29213 y como control negativo *S. hominis* ATCC 27844. La biopelícula se solubilizó con ácido acético al 33%.

6.4.3 Clasificación de producción de biopelícula

Se utilizó el método reportado por Stepanović (Stepanovic et al., 2007), clasificando las cepas según la densidad óptica (DO) como:

- No productora: DO < DO_c
- Productora débil: DO_c < DO < 2xDO_c
- Productora moderada: 2xDO_c < DO < 4xDO_c
- Productora fuerte: 4xDO_c < DO

Donde DO_c es el valor promedio de las réplicas de absorbancia del control negativo más tres veces su desviación estándar.

6.5 Identificación de picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula

Los espectros generados mediante MALDI-TOF se normalizaron utilizando el programa FlexAnalysis 3.4 (Bruker, Billerica, MA, EUA) y se analizaron con

ClinProTools 3.0 (Bruker, Billerica, MA, EUA) para comparar grupos e identificar posibles picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de especies bacterianas comparadas para la búsqueda de picos biomarcadores

Bacteria	Clasificación
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i> resistentes a vancomicina vs <i>Enterococcus sp.</i> susceptibles a vancomicina
	VRE productores de biopelícula vs VRE no productores de biopelícula
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> resistentes a meticilina vs <i>S. aureus</i> susceptibles a meticilina
	MRSA productores de biopelícula vs MRSA no productores de biopelícula

6.6 Determinación de identidad peptídica de picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula

Para determinar la identidad peptídica de los picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula se utilizó el programa Biotools (Bruker, Billerica, Massachusetts, EUA) que, usando el servidor de MASCOT (MatrixScience, London, United Kingdom), predice la identidad peptídica con base en su peso molecular en Daltons. Se analizarán los valores de puntuación de MASCOT y porcentaje de identidad, y se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

6.7 Determinar la respuesta inmune *in vitro* de PBMC co-cultivadas con biopelícula y células planctónicas

Se evaluaron las cepas productoras fuertes de biopelícula *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina. y *S. aureus* resistente a meticilina.

6.7.1 Obtención de PBMC

Se obtuvo sangre de donadores sanos y se diluyó 1:1 con solución de fosfatos (PBS). La mezcla se separó por gradiente de densidad con 1:3 de Ficoll-Paque plus (GE Healthcare Bioscience AB, Upsala, Suecia), centrifugándose a 400 x g durante 30 min. Las PBMC se recolectaron, se contabilizaron en cámara de Neubauer y se resuspendieron en medio RPMI suplementado al 10% con plasma autólogo e inactivado por calor.

6.7.2 Co-cultivo de PBMC con biopelícula madura

Las biopelículas se generaron a partir de una dilución 1:100 en TSB suplementado con 1.0 % de glucosa en el Dispositivo de Biopelícula de Calgary (DBC). Después de 24 h de incubación, las biopelículas maduras que crecieron en las clavijas del DBC, se lavaron tres veces en solución salina estéril y co-cultivaron en una caja de microtitulación de 96 pocillos con 200 μ L de 4×10^6 células/pocillo de PBMC durante 24 h a 37°C con 5 % de CO₂. Como control negativo se utilizaron PBMC sin estímulo y PBMC estimuladas con 10 mg/mL de Concanavalina A (ConA) como control positivo. Los sobrenadantes se recolectaron por centrifugación a 400 x g durante 5 min, se filtraron (0.22 μ m) y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

6.7.3 Co-cultivo de PBMC con bacterias planctónicas

Los cultivos en fase exponencial se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 min y el concentrado bacteriano se resuspendió en medio RPMI completo. Se mezclaron con 100 μ L de 4×10^6 PBMC/pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos, incubando 24 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Como control negativo se utilizaron PBMC sin estimular y PBMC estimuladas con 10mg/mL de ConA como control positivo. Finalmente se incubó a 37°C durante 24 h con 5.0% de CO₂. Se recolectaron los sobrenadantes como se describió previamente.

6.7.4 Evaluación de viabilidad y activación celular

Posterior a las 24 h de co-cultivo de PBMC con biopelícula madura o con células bacterianas planctónicas, se evaluó la viabilidad celular utilizando Calceína-AM (Invitrogen, Massachusetts, EUA) y la activación celular mediante la detección del marcador CD69 en células viables, usando el anticuerpo anti-CD69 (555533, BD Biosciences). Ambos análisis se realizaron por citometría de flujo en el equipo FACSCantoII (BD Bioscience, Nueva Jersey, EUA), recolectando 10,000 eventos por muestra. Se incluyeron, además de los grupos experimentales, controles negativo (PBMC sin estímulo) y controles positivos (PBMC + ConA 10 µg/mL).

6.7.5 Determinación de citocinas proinflamatorias

A partir del sobrenadante de los co-cultivos de PBMC con células de biopelícula madura y células bacterianas en su forma planctónica, se cuantificaron TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, así como la interleucina-12p70 (IL-12p70) con el BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (CBA) - I Kit (BD Bioscience, Nueva Jersey, EUA). Se realizó la curva de estandarización (**Tabla 2**) como indica el fabricante.

Tabla 2. Concentraciones utilizadas para realizar la curva de estandarización del BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (CBA) - I Kit

Tubo	Concentración (pg/mL)	Dilución
1	0 (control negativo)	Sin dilución (solo diluente)
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312.5	1:16
7	625	1:8
8	1,250	1:4
9	2,500	1:2
10	5,000	Sin dilución

Se preparó un master mix con 10 μ L de cada citocina (Reactivos Capture beads A1-A6) por cada muestra que se analizó. En un tubo de microcentrifuga se colocaron 50 μ L del sobrenadante filtrado, se añadieron 50 μ L del Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent y 50 μ L de la mezcla maestra de capture beads. Posteriormente, se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente en un cuarto oscuro. Después de la incubación, se añadió 1 mL de buffer de lavado y se centrifugó a 200 x g durante 5 min, posteriormente se descartó el sobrenadante y se añadieron 300 μ L de buffer de lavado para resuspender el pellet conjugado con las capture bead. Las lecturas se obtuvieron mediante citometría de flujo con el equipo BD FACSCanto II (BD Bioscience, Nueva Jersey, EUA).

6.8 Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron en frecuencias absolutas y porcentajes. Para evaluar la asociación entre las IAAS y su procedencia, se aplicó la prueba de chi cuadrada (χ^2). Para comparar la viabilidad celular y la expresión del marcador CD69 entre grupos experimentales, se utilizó un ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Bonferroni. Para el análisis de la secreción de citocinas, se aplicó un ANOVA no paramétrico con prueba post-hoc de Dunn. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de $p < 0.05$. Estos análisis estadísticos, así como las gráficas se realizaron con el programa Graphpad PRISM versión 10.1.0. Para determinar posibles picos biomarcadores de resistencia y producción de biopelícula se aplicaron las pruebas de Anderson-Darling, t-test/ANOVA y Wilcoxon/Kruskal-Wallis en el ClinProTools 3.0.

7 Resultados

7.1 Identificación de cepas bacterianas causantes de IAAS

Se identificaron un total de 3,196 IAAS entre el 1 de enero de 2019 y el 31 de diciembre del 2022 (**Tabla 3**). Las especies bacterianas más prevalentes fueron *E. coli* (17.8 %), *A. baumannii* (16.6 %), *P. aeruginosa* (16 %), *K. pneumoniae* (14 %) y *S. aureus* (13.3 %). En las muestras provenientes de pacientes hospitalizados en el área COVID-19 (n = 454), las bacterias más frecuentes fueron *P. aeruginosa* (23.2 %), *K. pneumoniae* (17.7 %), *S. aureus* (17.7 %), *A. baumannii* (17.3 %) y *E. coli* (7.5 %). Por otra parte, en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (n = 511), predominó *A. baumannii* (25.4 %), seguida de *K. pneumoniae* (21.1 %), *P. aeruginosa* (15.9 %), *S. aureus* (14.1 %) y *E. faecalis* (13.3 %).

Las infecciones fueron más frecuentes en especímenes clínicos obtenidos de infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI), infecciones de piel y tejido blando (IPTB), infecciones del tracto urinario (ITU) y hemocultivos, con 1,453 (45.5 %), 568 (17.8 %), 443 (13.9 %) y 352 (11 %), respectivamente. En ITRI, las especies más prevalentes fueron *A. baumannii* (24.0 %), *P. aeruginosa* (19.1 %), *K. pneumoniae* (17.1 %), *S. aureus* (15.5 %) y *E. coli* (8.9 %). En IPTB, predominaron *E. coli* (22.4 %), *P. aeruginosa* (16.4 %), *S. aureus* (13.9 %), *A. baumannii* (11.8 %) y *K. pneumoniae* (8.5 %). En ITU, se observó predominio de *E. coli* (43.6 %), seguida de *P. aeruginosa* (11.3 %), *K. pneumoniae* (8.8 %), *E. faecalis* (7.9 %) y *A. baumannii* (6.1 %). En sangre, las especies más frecuentes fueron *K. pneumoniae* (23.9 %), *A. baumannii* (13.6 %), *E. coli* (13.4 %), *S. aureus* (13.4 %) y *E. faecalis* (10.2 %). Por otra parte, las infecciones intraabdominales (IIA) y las infecciones del líquido cefalorraquídeo (LCR) fueron menos frecuentes, con 80 (2.5 %) y 20 (0.6 %) casos, respectivamente. En ambos tipos de infecciones, *P. aeruginosa* fue la más prevalente, con 22.5 % en IIA y 26.3 % en LCR.

Finalmente, se observó una mayor frecuencia de IAAS en pacientes masculinos, con 1,944 (60.8 %) casos, en comparación con pacientes femeninas, con 1,159 (36.3 %) casos.

Tabla 3. Información de procedencia de los aislamientos bacterianos de IAAS de pacientes atendidos entre el 1 de enero de 2019 y el 31 de diciembre de 2022.

Patógeno	Global n=3,196	Procedencia n (%)				Especímenes clínicos n (%)					Sexo del paciente n (%)			
		Área COVID-19 n=452	UCI n=511	Otros n=2233	ITRI n=1453	Sangre n=352	IIA n=80	ITU n=443	IPTB n=568	LCR n=19	Otro n=281	Hombre n=1944	Mujer n=1159	ND
Gram positivo														
<i>Staphylococcus aureus</i>	426 (13.3)	80 (17.7)	72 (14.1)	274 (12.3)	223 (15.5)	47 (13.4)	4 (5.0)	4 (0.9)	79 (13.9)	5 (26.3)	64 (22.8)	288 (14.8)	135 (11.6)	3 (0.7)
<i>Enterococcus faecalis</i>	156 (4.9)	9 (2.0)	17 (13.3)	130 (5.8)	19 (1.3)	36 (10.2)	5 (6.3)	35 (7.9)	38 (6.7)	3 (15.8)	20 (7.1)	89 (4.6)	54 (4.7)	13 (8.3)
<i>Enterococcus faecium</i>	49 (1.5)	2 (0.4)	6 (1.2)	41 (1.8)	4 (0.3)	8 (2.3)	6 (7.5)	17 (3.8)	8 (1.4)	0 (0.0)	6 (2.1)	22 (1.1)	26 (2.2)	1 (2.04)
Gram negativo														
<i>Acinetobacter baumannii</i>	532 (16.6)	78 (17.3)	130 (25.4)	324 (14.5)	349 (24.0)	48 (13.6)	6 (7.5)	27 (6.1)	67 (11.8)	2 (10.5)	33 (11.7)	346 (17.8)	183 (15.8)	3 (0.6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	510 (16.0)	105 (23.2)	81 (15.9)	324 (14.5)	278 (19.1)	31 (8.8)	18 (22.5)	50 (11.3)	93 (16.4)	5 (26.3)	35 (12.5)	324 (16.7)	177 (15.3)	9 (1.8)
Enterobacteriales														
<i>Escherichia coli</i>	569 (17.8)	34 (7.5)	32 (6.3)	503 (22.5)	130 (8.9)	47 (13.4)	16 (20.0)	193 (43.6)	127 (22.4)	0 (0.0)	56 (19.9)	287 (14.8)	273 (23.6)	9 (1.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	449 (14.0)	80 (17.7)	108 (21.1)	261 (11.7)	248 (17.1)	84 (23.9)	11 (13.8)	39 (8.8)	48 (8.5)	2 (10.5)	17 (6.8)	282 (14.5)	124 (10.7)	43 (9.6)
<i>Enterobacter cloacae</i>	143 (4.5)	15 (3.3)	19 (3.7)	109 (4.9)	61 (4.2)	16 (4.5)	5 (6.3)	11 (2.5)	33 (5.8)	2 (10.5)	15 (5.3)	86 (4.4)	52 (4.5)	5 (3.5)
<i>Proteus mirabilis</i>	87 (2.7)	10 (2.2)	9 (1.8)	68 (3.0)	29 (2.0)	3 (0.9)	3 (3.8)	16 (3.6)	29 (5.1)	0 (0.0)	7 (2.5)	51 (2.6)	36 (3.1)	0 (0.0)
<i>Serratia marcescens</i>	49 (1.5)	17 (3.8)	14 (2.7)	18 (0.8)	31 (2.1)	7 (2.0)	1 (1.3)	2 (0.5)	3 (0.5)	0 (0.0)	5 (1.8)	32 (1.6)	13 (1.1)	4 (8.2)
<i>Citrobacter freundii</i>	33 (1.0)	4 (0.9)	1 (0.2)	28 (1.3)	12 (0.8)	1 (0.3)	2 (2.5)	3 (0.7)	11 (1.9)	0 (0.0)	4 (1.4)	23 (1.2)	9 (0.8)	1 (3.0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	33 (1.0)	1 (0.2)	7 (1.4)	25 (1.1)	13 (0.9)	10 (2.8)	0 (0.0)	7 (1.6)	3 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	18 (0.9)	15 (1.3)	0 (0.0)
<i>Morganella morganii</i>	28 (0.9)	1 (0.2)	2 (0.4)	25 (1.1)	7 (0.5)	1 (0.3)	0 (0.0)	7 (1.6)	8 (1.4)	0 (0.0)	5 (1.8)	18 (0.9)	10 (0.9)	0 (0.0)
<i>Providencia rettgeri</i>	24 (0.8)	2 (0.4)	0 (0.0)	22 (1.0)	4 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (3.6)	1 (0.2)	0 (0.0)	3 (1.1)	17 (0.9)	7 (0.6)	0 (0.0)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	27 (0.8)	7 (1.5)	3 (0.6)	17 (0.8)	17 (1.2)	2 (0.6)	1 (1.3)	3 (0.7)	2 (0.4)	0 (0.0)	2 (0.7)	16 (0.8)	10 (0.9)	1 (3.7)
<i>Klebsiella variicola</i>	15 (0.5)	1 (0.2)	3 (0.6)	11 (0.5)	7 (0.5)	2 (0.6)	0 (0.0)	2 (0.5)	3 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.4)	11 (0.6)	3 (0.3)	1 (6.7)
<i>Proteus hauseri</i>	8 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)	3 (0.7)	2 (0.4)	0 (0.0)	2 (0.7)	4 (0.2)	4 (0.3)	0 (0.0)
<i>Salmonella</i> sp.	8 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (0.4)	1 (0.1)	4 (1.1)	0 (0.0)	1 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.4)	5 (0.3)	3 (0.3)	0 (0.0)
<i>Citrobacter koseri</i>	7 (0.2)	4 (0.9)	1 (0.2)	2 (0.1)	5 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.3)	2 (0.2)	0 (0.0)
<i>Enterobacter asburiae</i>	5 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.2)	4 (0.2)	2 (0.1)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.1)	4 (0.3)	0 (0.0)
<i>Proteus vulgaris</i>	5 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.2)	4 (0.2)	2 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.4)	3 (0.2)	2 (0.2)	0 (0.0)
Otras especies	33 (1.0)	2 (0.4)	4 (0.8)	27 (1.2)	11 (0.8)	3 (0.9)	1 (1.3)	5 (1.1)	9 (1.6)	0 (0.0)	4 (1.4)	16 (0.8)	17 (1.5)	0 (0.0)

UCI, Unidad de cuidados intensivos; ITRI, infección del tracto respiratorio inferior; IIA, infección intraabdominal; ITU, infección del tracto urinario; IPTB, infección de piel y tejido blando; LCR, líquido cefalorraquídeo; ND, no determinado

7.2 Susceptibilidad a antibióticos de especies bacterianas del grupo ESKAPE

Se evaluó la susceptibilidad a antibióticos en 1,488 aislamientos bacterianos relacionados con IAAS para definir aquellos pertenecientes al grupo ESKAPE (**Tabla 4**). Se determinó que 458 (30.78 %) aislamientos fueron resistentes a antibióticos, distribuidos de la siguiente manera: ABRC, 225 (49.1 %); SARM, 105 (22.9 %); *P. aeruginosa* MDR, 91 (19.9 %); ERV 22, (4.8 %); y ERC, 12 (1.2 %).

En particular, *A. baumannii* representó más del 50 % de las infecciones en el área COVID-19 y la UCI, con 62 (50,8 %) y 83 (76,9 %) casos, respectivamente. Se observó una diferencia significativa en la distribución de infecciones por SARM entre áreas hospitalarias ($p = 0.006$), con una mayor frecuencia en el área COVID-19 (37 casos; 30.3 %) en comparación con la UCI (13 casos; 2 %). En contraste, no se encontraron diferencias significativas en la procedencia de los demás aislamientos ESKAPE ($p > 0.05$).

Tabla 4. Epidemiología de bacterias ESKAPE

Patógeno	Global (n=458)	Procedencia			<i>p</i>	
		n (%)		<i>p</i>		
		Área COVID-19 (n=122)	UCI (n=108)			
Gram positivo						
<i>Staphylococcus aureus</i> SARM	105 (22.9)	37 (30.3)	13 (12.0)	0.006		
<i>Enterococcus</i> spp ERV	22 (4.8)	3 (2.5)	4 (3.7)	0.763		
Gram negativo						
<i>Acinetobacter baumannii</i> ABRC	225 (49.1)	62 (50.8)	83 (76.9)	0.161		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	91 (19.9)	17 (13.9)	7 (6.5)	0.071		
Otras Enterobacteriales ERC				0.510		
<i>Escherichia coli</i>	2 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.9)			
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (0.2)	1 (0.8)	0 (0.0)			
Otros Enterobacteriales	10 (2.2)	2 (1.6)	0 (0.0)			

UCI, Unidad de cuidados intensivos; SARM, *S. aureus* resistentes a meticilina; ERV, *Enterococcus* spp resistentes a vancomicina; ABRC, *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos; ERC, Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos.

7.3 Identificación de picos biomarcadores potenciales para resistencia

Se analizaron los patrones de picos proteicos en los espectros MALDI-TOF de los aislamientos de *Enterococcus* spp. (14 resistentes y 18 susceptibles a vancomicina), *S. aureus* (26 resistentes y 28 susceptibles a meticilina) y *P. aeruginosa* (25 MDR y 18 no MDR).

En la **Figura 17** se presentan los espectros obtenidos para *Enterococcus* spp. resistentes (rojo) y susceptibles (azul) a vancomicina; la **Figura 18** muestra los espectros de *S. aureus* resistentes (rojo) y susceptibles (azul) a meticilina; y la **Figura 19** corresponde a *P. aeruginosa* MDR (rojo) y no MDR (azul). En el eje X se representa la relación masa-carga (m/z) en Dalton, y en el eje Y, la intensidad relativa de iones detectados.

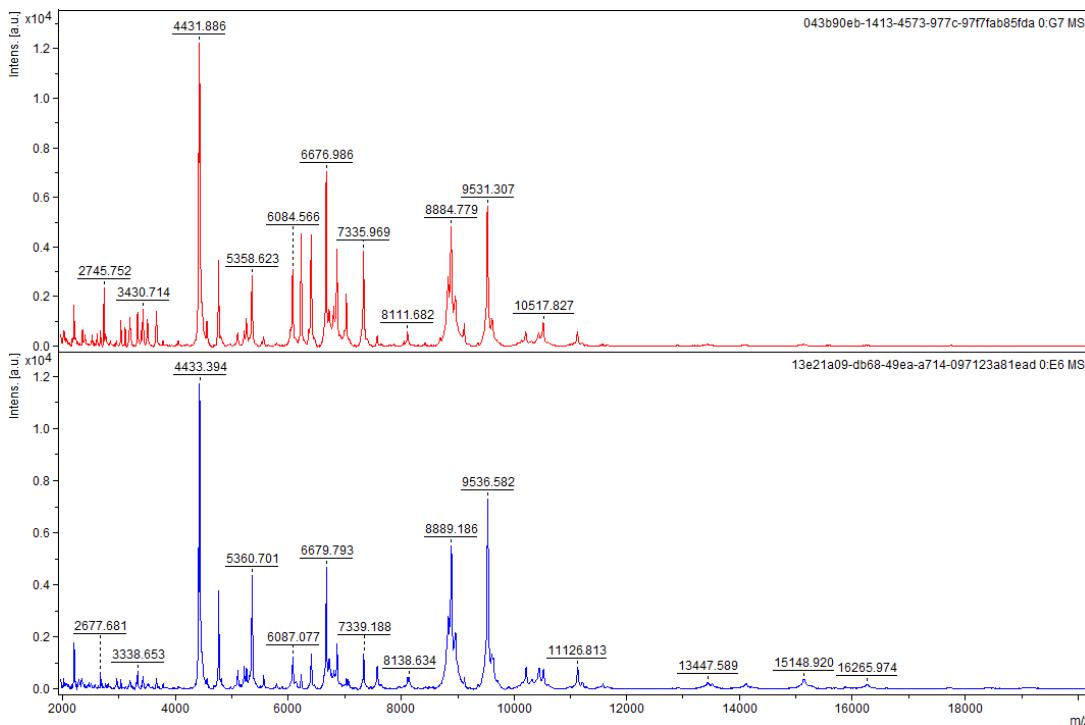


Figura 19. Espectro de masas de *Enterococcus* sp. (rojo) Resistente a vancomicina (azul) Susceptible a vancomicina

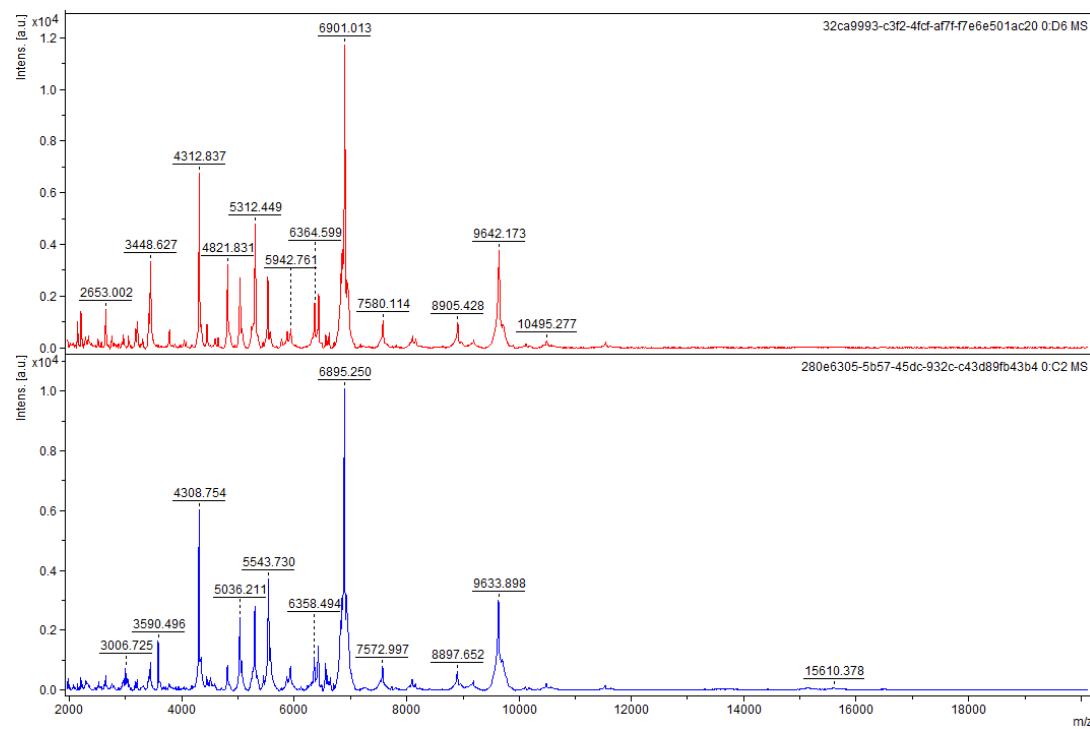


Figura 20. Espectro de masas *S. aureus*. (rojo) Resistente a meticilina (azul) Susceptible a meticilina

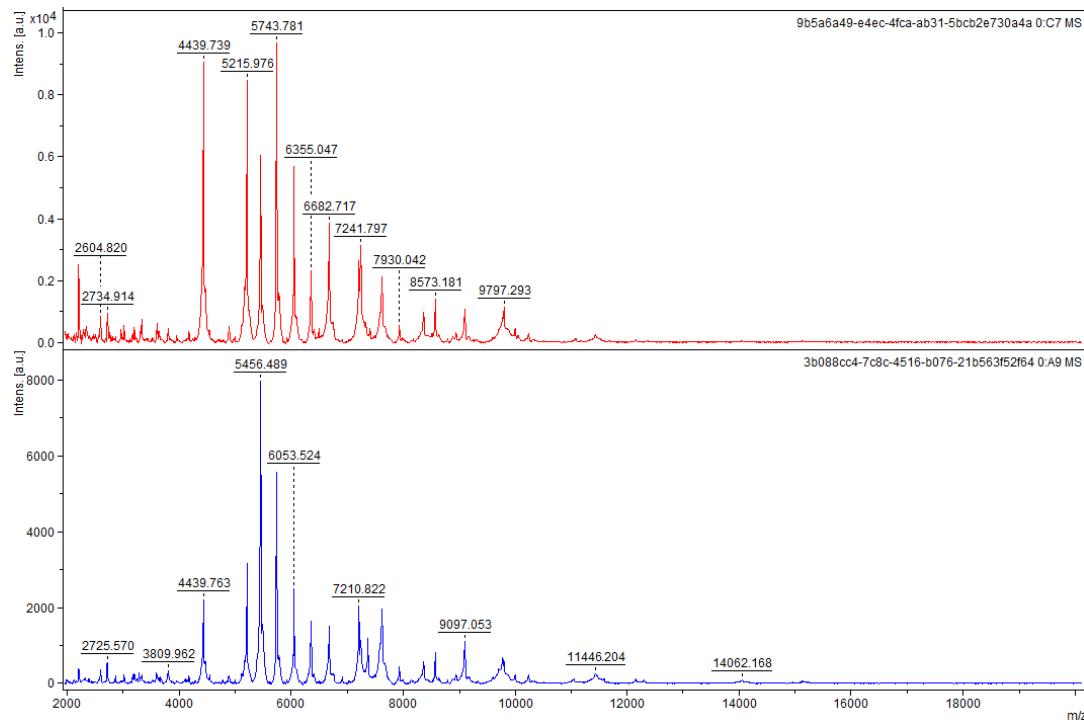


Figura 21. Espectro de masas de *P. aeruginosa*. (rojo) Cepa MDR (azul) Cepa no MDR

Con el programa ClinProTools se identificaron 125 picos teóricos para *Enterococcus* spp., de los cuales 5 resultaron potenciales biomarcadores ($p < 0.001$); 117 picos teóricos para *S. aureus*, con 4 biomarcadores potenciales ($p < 0.001$); y 88 picos teóricos para *P. aeruginosa*, también con 4 biomarcadores potenciales ($p < 0.001$) (Tabla 5).

Tabla 5. Picos teóricos para el fenotipo resistente de las bacterias ESKAPE

Especies, fenotipo resistente (n)	Picos teóricos ($p \leq 0.05$)		Biomarcadores potenciales		
	n	N	m/z	ABC	p
<i>Enterococcus</i> spp, Resistente a vancomicina (14) vs susceptible a vancomicina (18)	125	5	3,446.67	0.90	<0.001
			3,788.51	0.90	<0.001
			5,221.62	0.90	<0.001
			5,263.24	0.90	<0.001
			6,348.99	0.92	<0.001
<i>S. aureus</i> , resistentes a meticilina (26) vs susceptibles a meticilina (28)	117	4	3,590.93	0.93	<0.001
			5,458.31	0.89	<0.001
			6,579.99	0.91	<0.001
			6,619.47	0.81	<0.001
<i>P. aeruginosa</i> , multidrogoresistente (25) vs no multidrogoresistente (18)	88	4	2,215.36	0.94	<0.001
			3,175.54	0.93	<0.001
			3,604.36	0.8	<0.001
			3,619.43	0.88	<0.001

ABC, Área bajo la curva.

En la Figura 22 se muestran los picos biomarcadores para *Enterococcus* spp. Los picos 3,446.67 y 6,348.99 m/z fueron característicos de cepas ERV, mientras que los picos 3,788.51, 5,221.62 y 5,263.24 m/z se observaron en ESV. La Figura 23 presenta los cuatro picos biomarcadores de *S. aureus* (3,590.93, 5,458.31, 6,579.99 y 6,619.47 m/z), encontrados en cepas SASM. Finalmente, la Figura 24 muestra los cuatro picos de *P. aeruginosa* MDR (2,215.36, 3,175.54, 3,604.36 y 3,619.43 m/z).

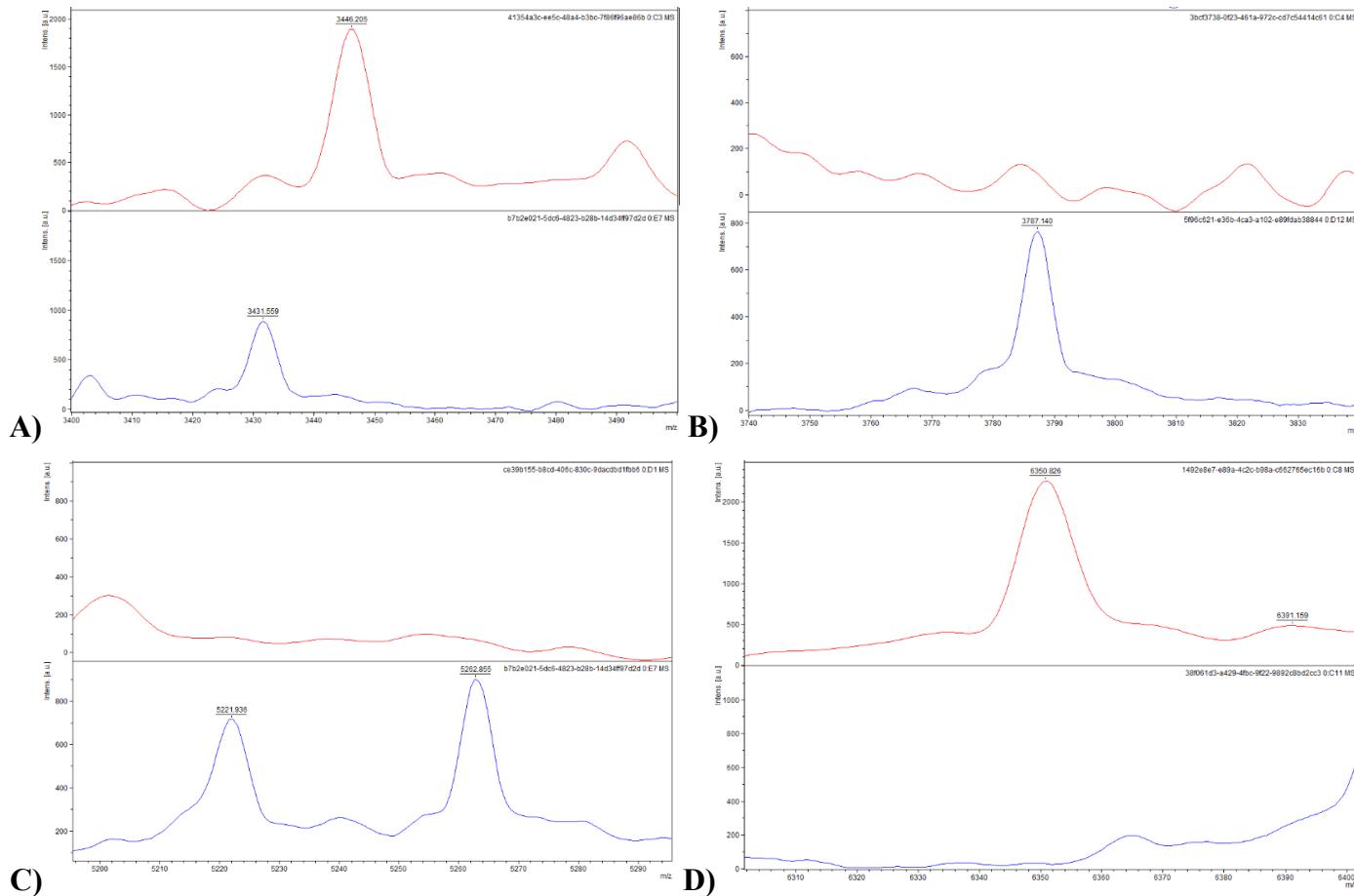


Figura 22. Picos biomarcadores potenciales para susceptibilidad a vancomicina de *Enterococcus* spp. Resistentes (rojo) Susceptible (azul) **A)** Pico de 3,446.67 m/z presente en muestras resistentes **B)** Pico de 3,788.51 m/z presente en muestras susceptibles **C)** Picos de 5,221.62 y 5,263.24 m/z presentes en muestras susceptibles **D)** Pico de 6,348.99 m/z presente en muestras resistentes.

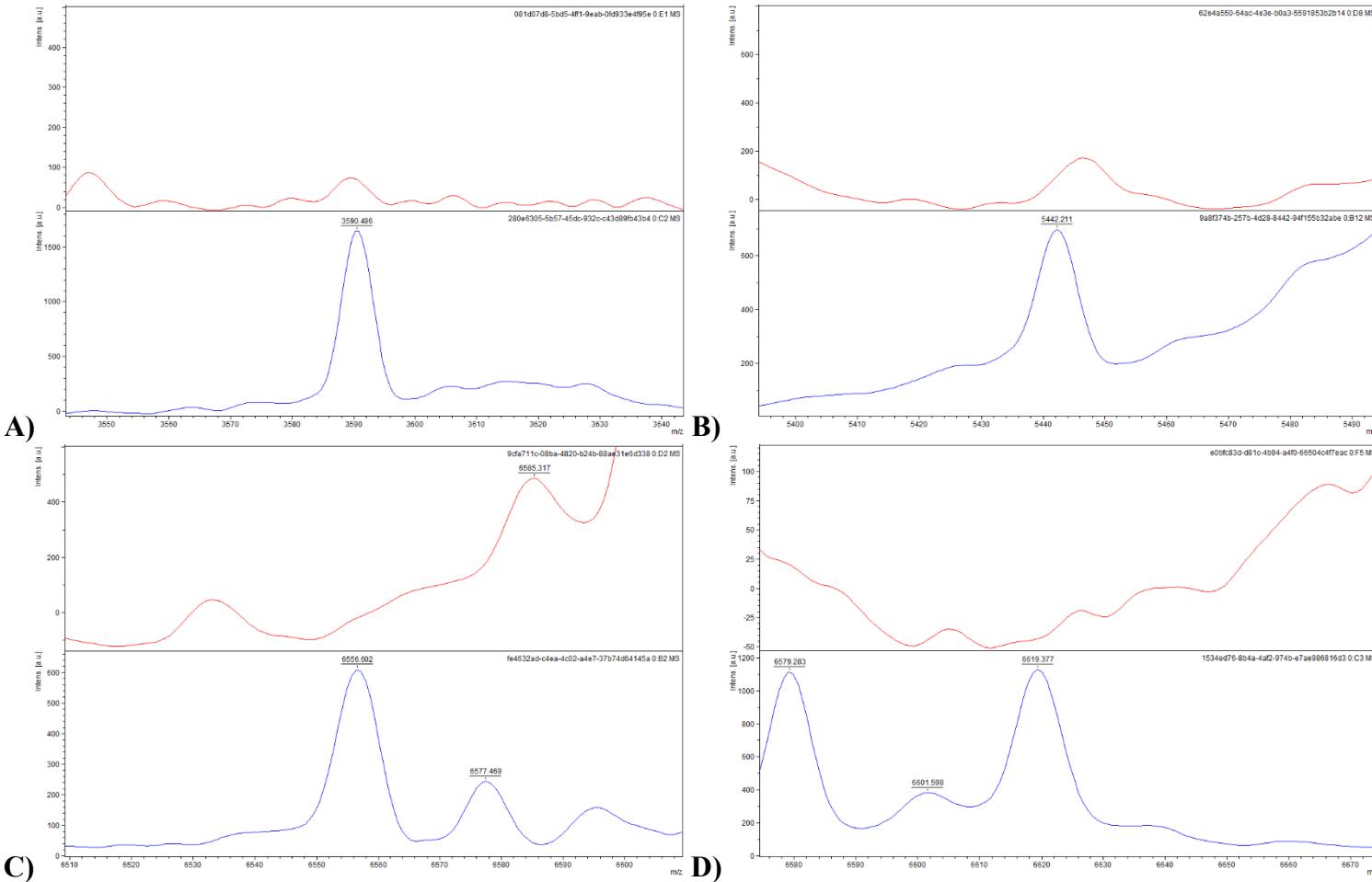


Figura 23. Picos biomarcadores potenciales para susceptibilidad a meticilina de *S. aureus*. Resistentes (rojo) Susceptible (azul) **A)** Pico de 3,590.93 m/z presente en muestras susceptibles **B)** Pico de 5,458.31 m/z presente en muestras susceptibles **C)** Pico de 6,579.99 m/z presente en muestras susceptibles **D)** Pico de 6,619.47 m/z presente en muestras susceptibles.

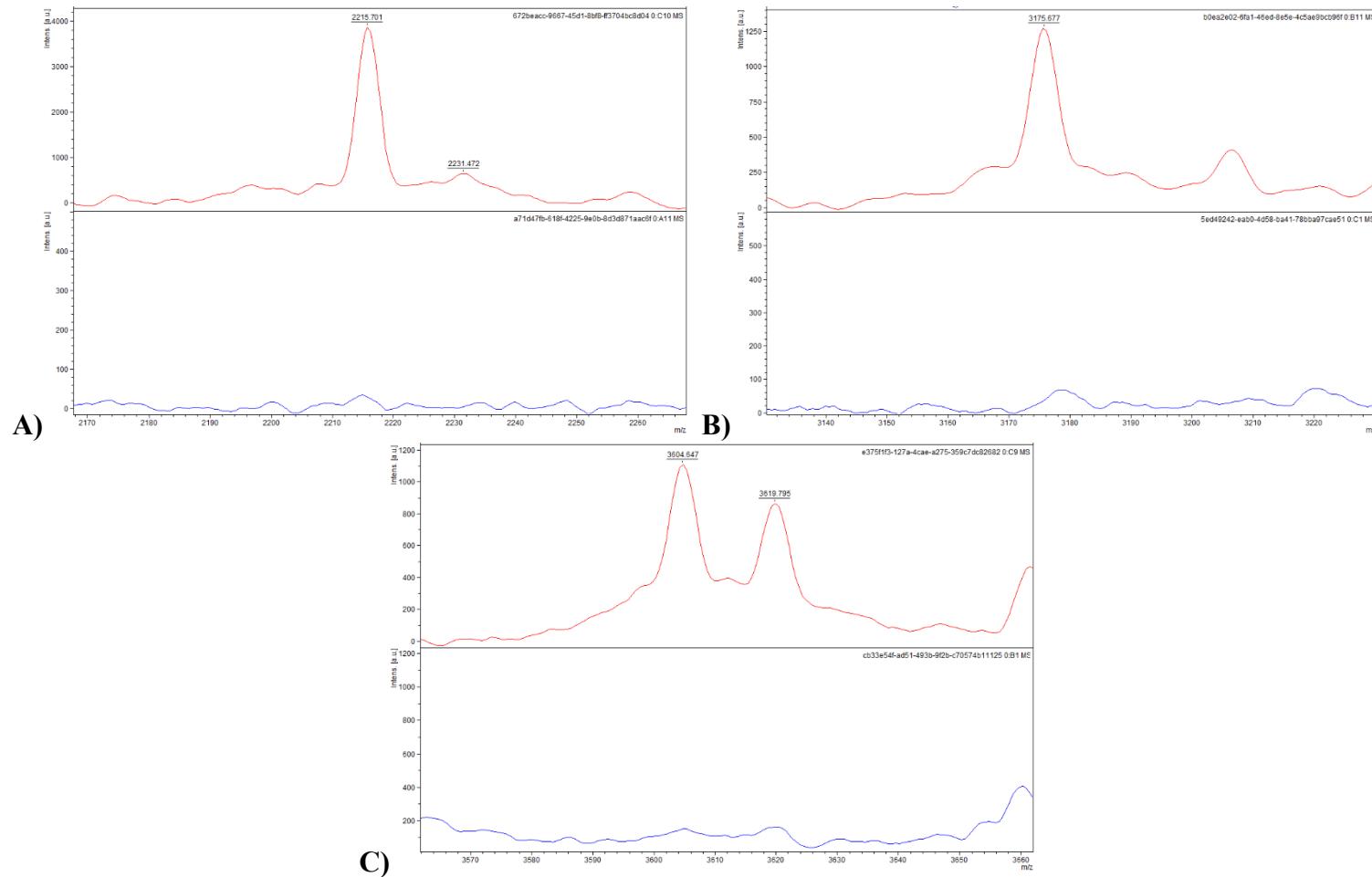


Figura 24. Picos biomarcadores potenciales para susceptibilidad de *P. aeruginosa* MDR. Resistentes (rojo) Susceptible (azul) **A)** Pico de 2,215.36 m/z presente en muestras resistentes **B)** Pico de 3,175.54 m/z presente en muestras resistentes **C)** Picos de 3,604.36 y 3,619.43 m/z presentes en muestras resistentes.

7.4 Producción de biopelícula en Gram positivas del grupo ESKAPE

Se evaluó la producción de biopelícula en 14 aislamientos ERV, identificándose 9 cepas no productoras y 5 productoras con la siguiente distribución: 1 débil, 1 moderada y 3 fuertes. Para los 24 aislamientos SARM, se identificaron 13 no productoras y 11 productoras: 9 débiles, 1 moderada y 1 fuerte (**Figura 25**).

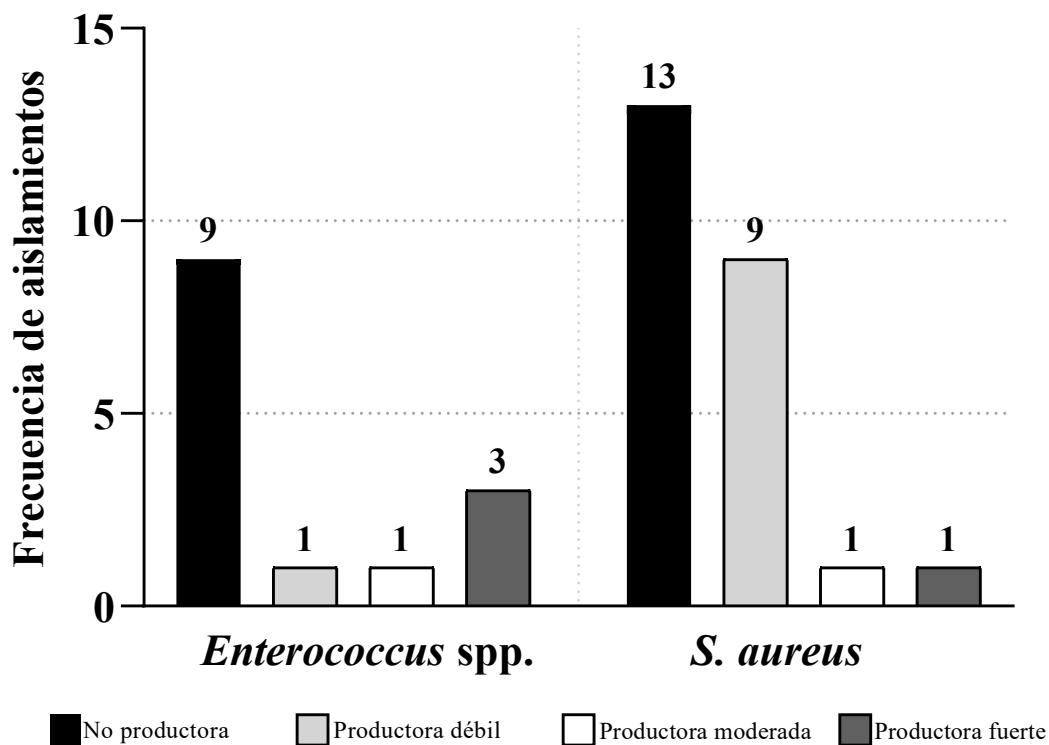


Figura 25. Cuantificación de producción de biopelícula mediante tinción con cristal violeta

7.5 Picos biomarcadores de farmacorresistencia y producción de biopelícula

En la **Figura 26** se comparan los espectros de masas de un aislamiento ERV productor y otro no productor de biopelícula (**Figura 26-A**), así como de un SARM productor y un no productor (**Figura 26-B**).

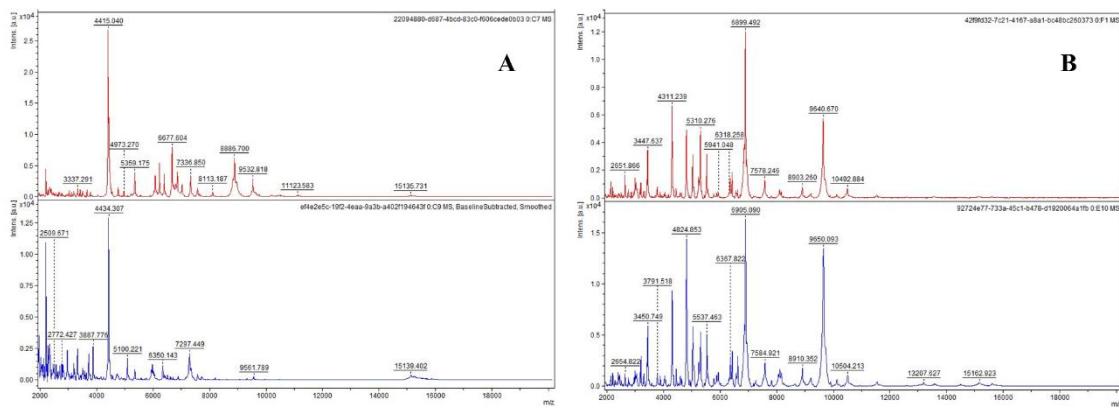


Figure 26. Espectro de masas de especies ESKAPE Gram positivas productoras de biopelícululas y no productoras de biopelícululas. Se muestra la comparación de una muestra de espectro de masas de microorganismos Gram positivos productores de biopelícululas y no productores de biopelícululas. **A)** Enterococcus spp. productor de biopelícululas (rojo) y no productor de biopelícululas (azul); **B)** S. aureus productor de biopelícululas (rojo) y no productor de biopelícululas (azul).

El análisis con ClinProTools arrojó 122 picos teóricos para ERV, y 99 para SARM; sin embargo, no se identificaron picos biomarcadores significativos asociados a la producción de biopelícula en ninguno de los grupos ($p > 0.05$) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Picos teóricos para el fenotipo de producción de biopelículula

Especies, fenotipo productor de biopelículula(n)	Picos teóricos				
	($p \leq 0.05$)	Biomarcadores potenciales			
	n	N	m/z	ABC	p
ERV productor de biopelículula (5) vs no productor (9)	122	0	ND	ND	>0.05
SARM productor de biopelículula (13) vs no productor (11)	99	0	ND	ND	>0.05

ERV, *Enterococcus spp* resistente a vancomicina; SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; ABC, Área bajo la curva.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para evaluar posibles agrupaciones entre productoras y no productoras (**Figura 27**). En ERV, los puntos (rojos, productores; verdes, no productores) se dispersaron aleatoriamente, sin formar agrupaciones, lo que indica ausencia de patrones discriminantes. En SARM, los puntos se superpusieron mayormente, sugiriendo también una falta de diferenciación clara.

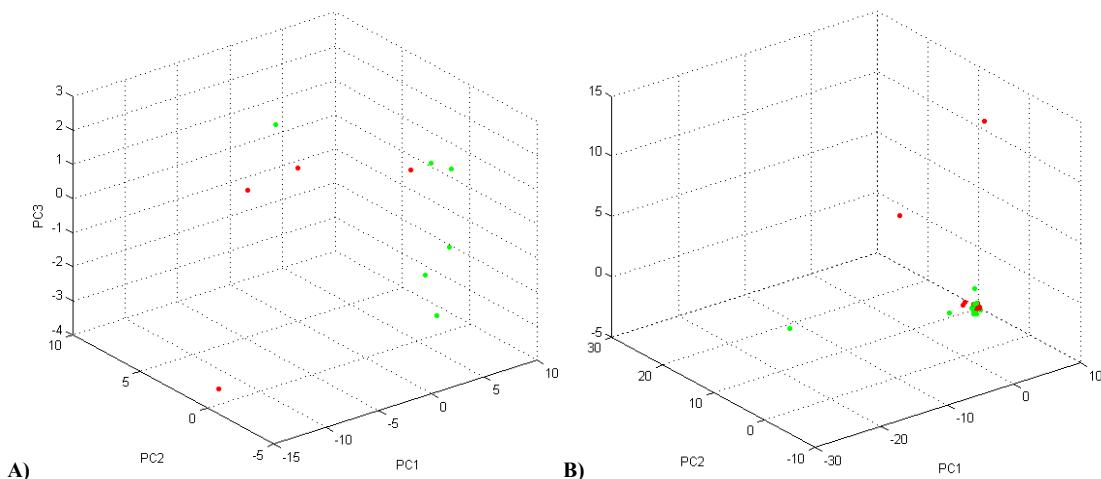


Figura 27. Análisis de Componentes Principales (ACP) de especies ESKAPE. El análisis de subgrupos de fenotipos específicos en todas las especies ESKAPE se incluye para A) ERV productor de biopelículas (rojo) y no productor de biopelículas (verde). B) SARM productor de biopelículas (rojo) y productor no de biopelículas (verde).

7.6 Identidad peptídica de los picos biomarcadores resistencia y producción de biopelícula

La asignación peptídica reveló puntuaciones Mascot de entre 23 y 36; además, cuatro picos presentaron cobertura de secuencia superior al 90 % (**Tabla 7**).

En *Enterococcus* spp., el pico 3,788,51 m/z fue identificado como el polipéptido tóxico LdrD (97 % de cobertura), con alta especificidad (100 %) y VPP del 100 %, pero menor sensibilidad (66,7 %) y VPN (70 %). Los picos 5,221,62 y 5,263,24 m/z se asignaron a la proteína de membrana UPF0391 BP 1737 (96–97 % de cobertura), con especificidad de 78.6–92.7 % y VPP de 82.4–92.3 %, pero sensibilidad y VPN más bajos (66.7–77.8 % y 68.4–73.3 %, respectivamente).

En *S. aureus*, el pico 5.458,31 m/z correspondió a la proteína I de espora soluble en ácido (45 % de cobertura), y el pico 3,590.93 m/z a la subunidad C de la ATP sintasa. Ambos mostraron especificidad y VPP del 100 %, aunque sensibilidad moderada (51.9 % y 70.4 %, respectivamente). El pico 6,579,99 m/z fue identificado como el lantipéptido Flv (96 % de cobertura), con especificidad (88.5 %) y sensibilidad (77.8 %) moderadas, VPP de 87.5 % y VPN de 79.3 %. El pico 6,619.47 m/z presentó baja identidad peptídica (30 %) y valores reducidos de especificidad (19.2 %), VPP (53.3 %) y VPN (62.5 %).

Para *P. aeruginosa*, los cuatro picos identificados presentaron baja cobertura (50-61 %). El pico 2,215.36 m/z mostró alta sensibilidad (96.0 %) y VPN (87.5 %), pero baja especificidad (38.9 %) y VPP (68.6). Los picos 3,175.54, 3,604.36 y 3,619.43 m/z mostraron alta especificidad (100 %, 94.4 % y 88.9 %, respectivamente) y VPP (100 %, 88.9 % y 85.7 %, respectivamente), pero baja sensibilidad (24 %, 32 % y 48 %, respectivamente) y bajo VPN (48.6 %, 50 %, y 55.2 %, respectivamente).

Tabla 7. Identidad peptídica de biomarcadores potenciales

Especies y grupo de clasificación	Picos teóricos (n)	Significación de biomarcador teórico				Identidad peptídica	Mascot score	Cobertura de secuencia peptídica (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)							
		n	m/z	ABC	p														
<i>Enterococcus</i> spp.																			
ERV (n = 14) vs ESV (n = 18)	125	5	3,446.67	0.90	<0.001	Protein translocase subunit SecE	23	50	64,3	88,9	81,8	76,2							
			3,788.51	0.90	<0.001	Small toxic polypeptide LdrD	28	97	66,7	100,0	100,0	70,0							
			5,221.62	0.90	<0.001	UPF0391 membrane protein BP 1737	32	96	66,7	92,7	92,3	68,4							
			5,263.24	0.90	<0.001	UPF0391 membrane protein BP 1737	32	94	77,8	78,6	82,4	73,3							
			6,348.99	0.92	<0.001	D-alanyl carrier protein	31	71	71,4	88,9	83,3	80,0							
Biopelícula, Productor (n = 4) vs no productor (n = 6)	122	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA							
<i>Staphylococcus aureus</i>																			
SARM (n = 26) vs SASM (n = 28)	117	4	3,590.93	0.93	<0.001	ATP synthase subunit c	23	45	70,4	100,0	100,0	76,5							
			5,458.31	0.89	<0.001	Small, acid-soluble spore protein I	29	71	51,9	100,0	100,0	66,7							
			6,579.99	0.91	<0.001	Lantipeptide Flv beta,d	36	96	77,8	88,5	87,5	79,3							
			6,619.47	0.81	<0.001	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase	29	30	88,9	19,2	53,3	62,5							
Biopelícula, productor (n = 11) vs no productor (n = 13)	99	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>																			
MDR (n = 25) vs non-MDR (n = 18)	88	4	2,215.36	0.94	<0.001	Cytochrome PQQ synthesis protein A	23	59	96,0	38,9	68,6	87,5							
			3,175.54	0.93	<0.001	UPF0391 membrane protein	24	61	24,0	100,0	100,0	48,6							
			3,604.36	0.80	<0.001	Protein translocase subunit SecE	23	50	32,0	94,4	88,9	50,0							
			3,619.43	0.88	<0.001	Large ribosomal subunit protein bL32	23	54	48,0	88,9	85,7	55,2							

ERV, *Enterococcus* spp resistente a vancomicina; SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; ESV, *Enterococcus* spp susceptible a vancomicina; SASM, *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina; ABC, Área bajo la curva; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

7.7 Respuesta inmune *in vitro* de PBMC co-cultivadas con biopelícula y células planctónicas de Gram positivas del grupo ESKAPE

7.7.1 Viabilidad y activación celular

Se evaluó la viabilidad de PBMC de donadores sanos co-cultivadas con ERV y SARM productoras fuertes de biopelícula, tanto en su forma planctónica como biopelícula madura a las 24 h (**Figura 28**). Los co-cultivos con SARM en ambos estados mantuvieron su viabilidad (~80 %), comparable a PBMC sin estímulo (81.1 %) o con ConA (80.9 %). El co-cultivo con biopelícula de ERV también presentó viabilidad similar (81 %), mientras que con ERV planctónicas se observó una disminución no significativa en la viabilidad celular (74.7 %) ($p > 0.05$).

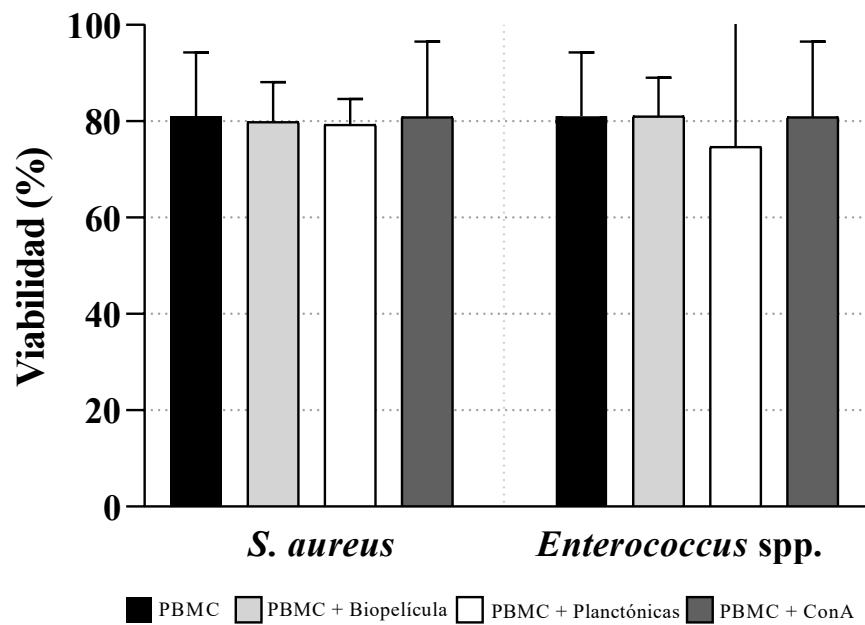


Figure 28. Viabilidad de las PBMC en co-cultivo con bacterias planctónicas y la biopelícula producida por A) *S. aureus* y B) *E. faecalis*. Las PBMC no estimuladas se utilizaron como controles negativos, mientras que las PBMC estimuladas con concanavalina A (ConA) se utilizaron como controles positivos de activación (n=8).

En cuanto a activación celular por CD69, los co-cultivos con SARM (planctónica y biopelícula) mostraron activación significativa ($p < 0.0001$) respecto al control sin estímulo, sin diferencias entre ambos estados bacterianos ($p > 0.999$). En contraste, el co-cultivo con ERV en estado planctónico indujo activación significativa ($p = 0.004$), mientras que su forma en biopelícula no generó cambios respecto al control. Además, se observó diferencia significativa entre PBMC co-cultivadas con ERV planctónica y en biopelícula ($p = 0.017$) (Figura 29).

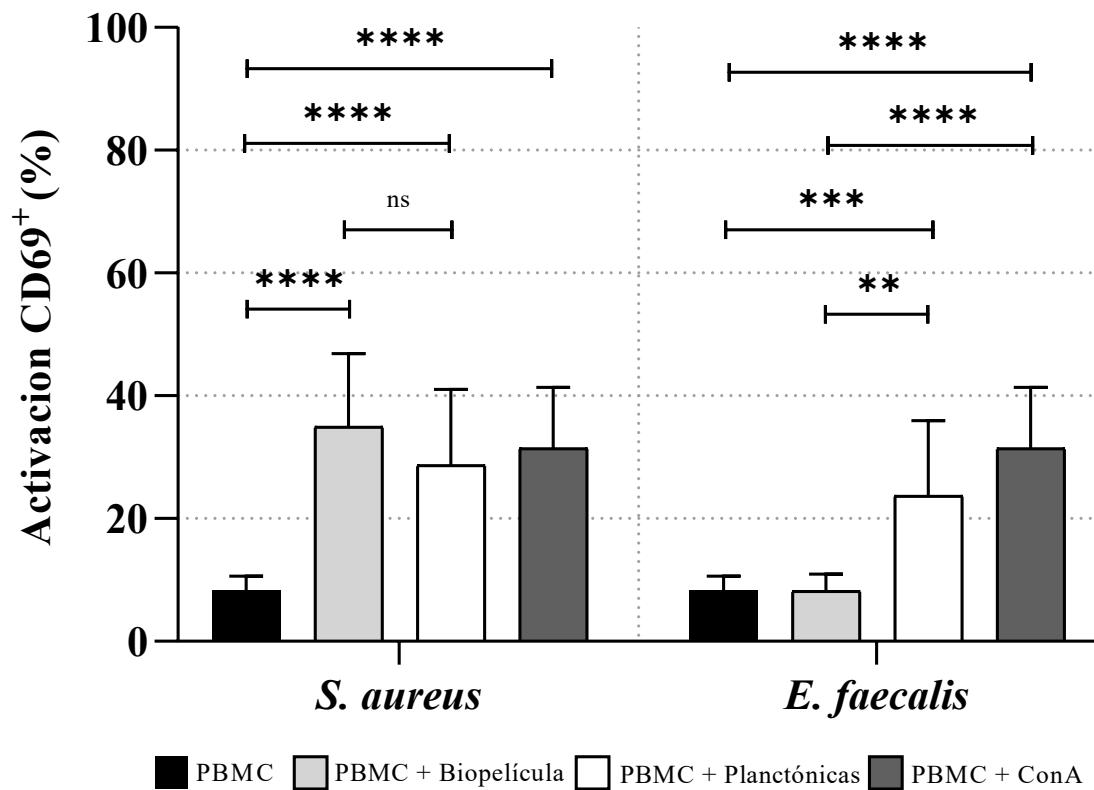


Figura 29. Expresión del marcador de activación temprana CD69 en PBMC estimuladas durante 24 h con bacterias planctónicas y biopelículas maduras de *S. aureus* y *E. faecalis*. Las PBMC no estimuladas se utilizaron como controles negativos, mientras que las PBMC estimuladas con concanavalina A se utilizaron como controles positivos de activación (n=8). *, $p < 0.05$; *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$.

7.7.2 Determinación de citocinas proinflamatorias

Las PBMC estimuladas con ConA secretaron mayores niveles de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en comparación con el control sin estímulo, aunque solo IL-8 alcanzó significancia ($p < 0.05$). La secreción de IL-12p70 fue mayor en el control sin estímulo, aunque sin significancia ($p > 0.999$).

En co-cultivos con SARM, la biopelícula indujo mayor secreción de todas las citocinas evaluadas en comparación con la forma planctónica. Las interleucinas IL-8, IL-1 β e IL-12p70 presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), mientras que IL-6 e IL-10 mostraron mayor significancia ($p < 0.01$). La secreción de TNF fue mayor pero no significativa ($p > 0.999$). Comparado con el control sin estímulo, las PBMC expuestas a biopelícula mostraron niveles significativamente más altos de IL-8, IL-1B, y TNF ($p < 0.01$). Por el contrario, IL-12p70 fue mayor en PBMC sin estímulo ($p < 0.01$) (**Figura 30**).

En los co-cultivos con ERV, IL-1 β , IL-8 e IL-10 fueron más abundantes en la forma planctónica, aunque solo IL-10 e IL-12p70 alcanzaron significancia ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). El co-cultivo con biopelícula indujo mayor TNF que el control ($p < 0.05$), mientras que IL-12p70 fue mayor en el control sin estímulo ($p < 0.05$) (**Figura 31**).

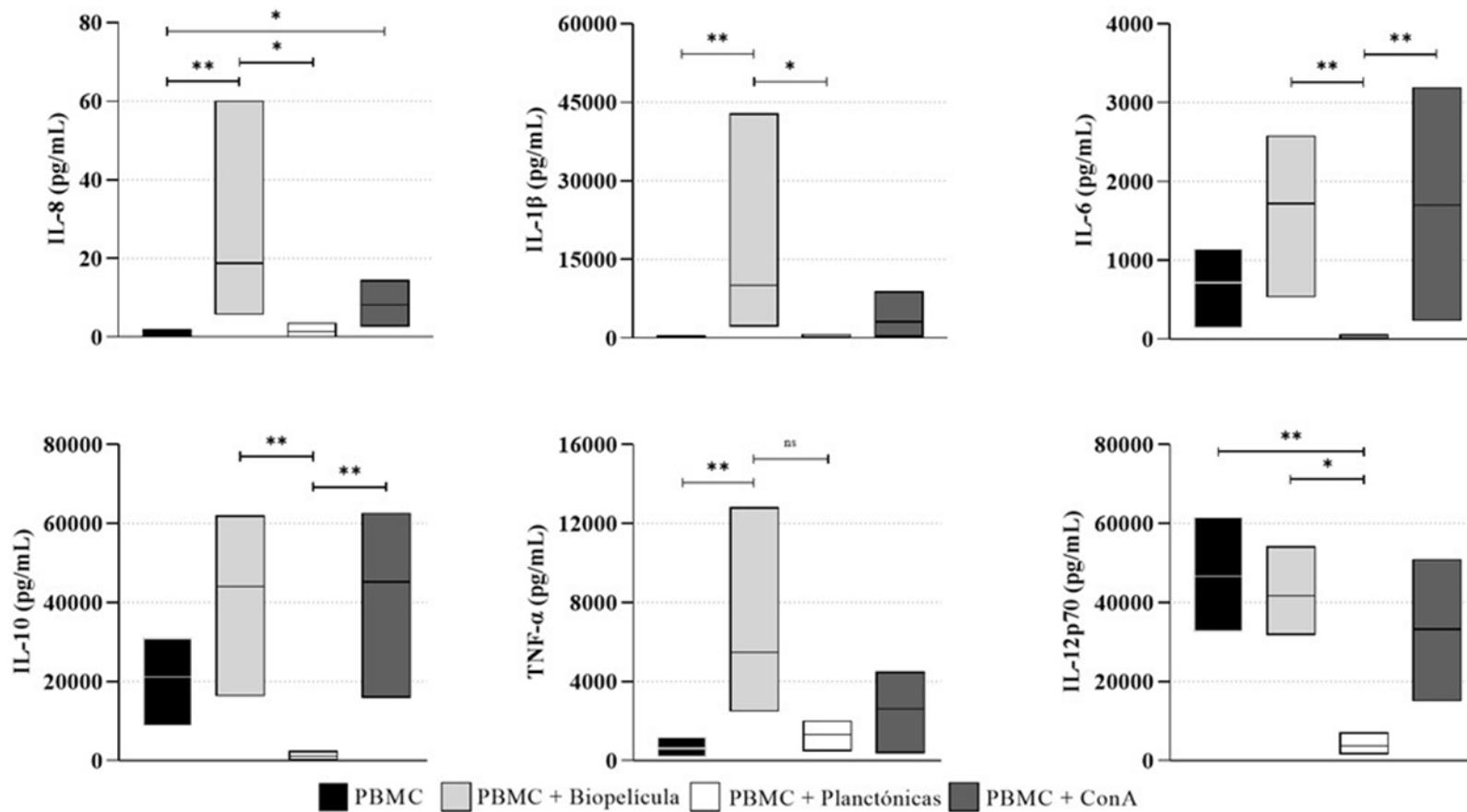


Figura 30. Liberación de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12P70) en co-cultivos de PBMC con *S. aureus* en estado planctónico y formando biopelícula madura de 24 h. ANOVA de una vía no paramétrica con prueba de posthoc de Dunns *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001

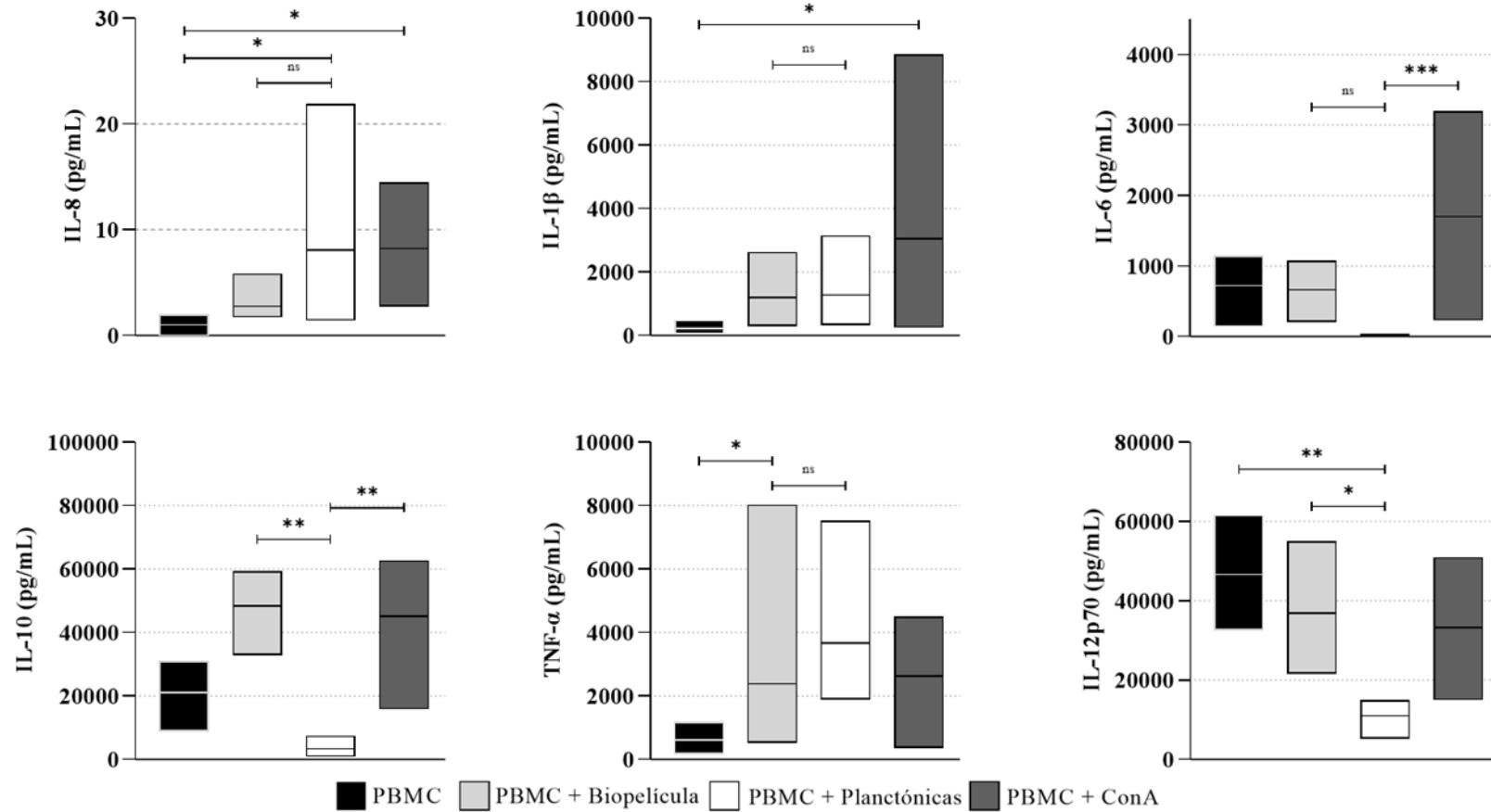


Figura 31. Liberación de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12P70) en co-cultivos de PBMC con *E. faecalis* en estado planctónico y formando biopelícula madura de 24 h. ANOVA de una vía no paramétrica con prueba de posthoc de Dunns *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001

8 Discusión

La aparición y propagación de bacterias resistentes en IAAS representa un importante problema de salud pública a nivel mundial (Mulani et al., 2019). Entre los principales agentes etiológicos destacan las bacterias del grupo ESKAPE, que incluyen ERV, SARM, ERC, ABRC y *P. aeruginosa* MDR (Ayobami et al., 2022). Estas bacterias poseen la capacidad formar biopelículas, que están conformadas por células bacterianas embebidas en una matriz polimérica extracelular, y que actúan como barrera física ante antibióticos y respuestas inmunes, facilitando su persistencia y resistencia (Pandey et al., 2021). En los últimos años, la espectrometría de masas MALDI-TOF se ha posicionado como una herramienta útil no solo para la identificación bacteriana rápida, sino también para la detección de perfiles de resistencia antimicrobiana y de producción de biopelícula (Flores-Treviño et al., 2019; Florio et al., 2020; Vrioni et al., 2018). Por otra parte, la mayoría de los estudios se han centrado en bacterias en estado planctónico, y existe escasa información sobre la respuesta inmune frente a biopelículas bacterianas, especialmente de patógenos ESKAPE (Kaya et al., 2021). Por lo tanto, este estudio se planteó como objetivo determinar la prevalencia de aislamientos del grupo ESKAPE durante cuatro años de vigilancia en un hospital de tercer nivel del noreste de México, y caracterizar su capacidad de formación de biopelícula, su resistencia antimicrobiana e identificación de biomarcadores mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS, así como evaluar la respuesta inmune in vitro de PBMC humanas frente a biopelículas y formas planctónicas.

A pesar de los esfuerzos por capacitar al personal sanitario sobre el uso adecuado de equipos de protección personal (EPP) y protocolos de higiene, la pandemia probablemente desvió la atención de las medidas estándar de prevención y control de infecciones, lo que contribuyó a un aumento en la incidencia de las IAAS (Barchitta et al., 2023; Cole & Barnard, 2021). Un estudio en países de América Latina reportó que en México se identificaron 1,042 pacientes con al menos un microorganismo causante de infección, el 12,8 % presentaron *A. baumannii*, 11,6 % para *P. aeruginosa*, 11,6 % para *K. pneumoniae*, 3,5 % para *S. aureus*, 1,2 % para *E. faecium*, 1,2 % de *E. faecalis*, y 1,2 % de *E. cloacae* (Huerta-Gutiérrez et al., 2019). En comparación, nuestro estudio mostró una prevalencia

más alta de patógenos ESKAPE en pacientes de UCI, con 16,6 % de *A. baumannii*, 16,0 % de *P. aeruginosa*, 14,0 % de *K. pneumoniae*, 13,3 % de *S. aureus*, 6,4 % de *Enterococcus* spp, y 4,5 % de *E. cloacae*. También informaron una mayor prevalencia de IAAS en pacientes masculinos (59 %, n = 79) en comparación con mujeres (41 %, n = 55) (Awuor et al., 2023). Nuestros hallazgos coinciden, determinando que el 62,6 % de las infecciones se produjeron en hombres, mientras que el 37,4 % fue en mujeres.

Los casos graves de infección por SARS-CoV-2 se asocian con un mayor riesgo de IAAS, especialmente entre los pacientes ingresados en la UCI. Un estudio de 2020 identificó 1,509 IAAS asociadas a la UCI, siendo *K. pneumoniae* (17 %), *Enterococcus* spp (15 %) *S. aureus* (13 %) y *A. baumannii* (12 %) los patógenos más comunes (Freire et al., 2023). De manera similar, otro estudio reportó que durante la pandemia las infecciones más frecuentes de bacterias Gram negativas y positivas fueron *A. baumannii* (52 %) y *S. aureus* (32 %), respectivamente (Durán-Manuel et al., 2021). Nuestros hallazgos son consistentes con estos estudios, ya que *A. baumannii* fue el patógeno Gram negativo más frecuente en la UCI (25,4 %) y *S. aureus* fue el patógeno Gram positivo más común tanto en la unidad COVID-19 como en la UCI, con 17,7% y 14,1%, respectivamente.

Algunos estudios sugieren que la prevalencia de bacterias multirresistentes o infecciones asociadas a la atención médica disminuyó durante la pandemia debido a las medidas de higiene intensificadas (Bentivegna et al., 2021). Sin embargo, nuestro estudio observó una tendencia diferente. Aunque la incidencia general de infecciones asociadas a la atención médica disminuyó, las infecciones bacterianas multirresistentes aumentaron, probablemente debido uso inadecuado de agentes antimicrobianos durante la pandemia (Lai et al., 2021). Por ejemplo, nuestro estudio encontró una mayor prevalencia de ERV (10,7 %) en comparación con informes anteriores (Jabbari Shiadeh et al., 2019). Con respecto a SARM, las tasas de resistencia varían a nivel mundial; en Argentina es del 88 %, en México es del 38 % y en Brasil varía del 4,5 al 8,6 % (Paes Leme et al., 2021). En nuestro estudio, encontramos una tasa de resistencia del 24,6 % a meticilina, menor comparado con los datos informados previamente para México.

A nivel mundial, la prevalencia de ABRC promedia el 72,4 %, aunque varía significativamente según la región, con informes que van del 1 al 81,7 % (Ayobami et al., 2022). En nuestro estudio, el 42,3 % de los aislamientos de *A. baumannii* fueron resistentes a los carbapenémicos. De manera similar, un estudio de los Estados Unidos informó que el 27,5 % (n = 523) de las infecciones por *P. aeruginosa* involucraron cepas MDR, mientras que nuestros datos mostraron que el 17,8 % (n = 91) de las infecciones por *P. aeruginosa* fueron MDR (Tabak et al., 2019).

La resistencia a los antimicrobianos y la producción de biopelículas en bacterias es un problema grave en todo el mundo, que causa altos costos económicos y carga de salud (Goelz & Kuofie, 2020). La producción de biopelículas se asocia con una colonización estable y de largo plazo, protegiendo a los microorganismos del sistema inmune del huésped a través de la inmunomodulación y secreción de moléculas con actividad antimicrobiana. Esto conlleva un gran impacto en la salud pública al demostrar que las biopelículas persisten en superficies y tejidos causando infecciones crónicas. Sin embargo, también tienen efectos benéficos, por ejemplo, pueden usarse como agentes de control biológico contra fitopatógenos y biofertilizantes, mejorando la producción de cultivos (Grande et al., 2020; Muhammad et al., 2020).

En nuestro estudio, la producción de biopelículas fue del 35,7 % en aislados de ERV. Un estudio previo reportó casi el 20 % de producción de biopelículas en aislados de *Enterococcus sp.*, independientemente de su perfil de susceptibilidad (Shridhar & Dhanashree, 2019). De manera similar a nuestros resultados, la resistencia a fármacos y la producción de biopelículas no pudieron estar asociadas en las cepas de *Enterococcus*. Mientras que para SARM, encontramos que 11 (45,8 %) eran productores de biopelículas, este valor es más alto en comparación con lo informado por Abd El-hamid y colaboradores en 2020, quienes determinaron que el 20,3 % de 32 muestras clínicas de SAMR eran productores de biopelículas (Abd El-hamid et al., 2020; Pandey et al., 2021).

La búsqueda de picos biomarcadores en los espectros de masas generados al realizar la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF agilizaría el proceso de subtificación, así

como también en la búsqueda de cepas resistentes a antibióticos o productoras de biopelícula (Calderaro & Chezzi, 2024). La comparación de ERV contra ESV arrojó cinco picos de biomarcadores potenciales, dos (3,446.67 y 6,348.99 m/z) en el grupo ERV, los cuales son similares a algunos reportados en la literatura, se ha reportado un pico de 3,454.44 m/z , similar a nuestro pico de 3,446.67 m/z , mientras que el pico encontrado de 6,348.99 m/z se ubica entre 2 picos de biomarcadores reportados siendo estos de 6,342 y 6,356 m/z (Sabença et al., 2020; Wang et al., 2021). Los picos encontrados en ESV obtuvieron los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad, sin embargo, no existen reportes de picos de biomarcadores en este grupo de bacterias, solo se han enfocado en picos presentes en ERV. En el caso de SARM contra SASM, se determinó una diferencia significativa en 4 de los 117 picos teóricos, todos ellos fueron encontrados en el grupo SASM. Aunque no existen reportes de que estos picos estén ausentes en SARM, un estudio encontró que existía un probable pico de biomarcador de 6,590 m/z en el grupo SARM, nosotros determinamos la existencia de un pico de 6,579 m/z similar a los reportados, sin embargo, el pico de biomarcador encontrado en este trabajo estuvo presente en SASM (Yu et al., 2022). Para *P. aeruginosa* MDR contra no-MDR, se encontró una diferencia significativa en 4 de los 88 picos teóricos, todos ellos se encontraron en el grupo MDR. No existen reportes en la literatura que sean similares a nuestros resultados, sin embargo, si existen estudios en donde se buscaron picos de biomarcadores para la detección de cepas altamente virulentas como ST175, determinaron que los picos de 6,911 y 7,359 m/z sirven para la rápida identificación de esta cepa (Mulet et al., 2021). Se determinó la presencia o ausencia de picos de biomarcadores teóricos para resistencia a antibióticos, esto indica que existe un patrón característico de picos de resistencia para SARM, ERV y *P. aeruginosa* MDR. La posibilidad de identificar proteínas podría entender la patogénesis de las bacterias y sus mecanismos de resistencia (Vrioni et al., 2018).

No fue posible identificar picos biomarcadores potenciales para la búsqueda de cepas SARM y ERV productores de biopelícula; esto puede deberse al bajo número de muestras evaluadas en los grupos productores de biopelícula y no productores de biopelícula. Además, actualmente el enfoque metodológico aplicado para identificar la producción de

biopelícula mediante MALDI TOF es diferente al realizado en este estudio; algunos reportes han comparado la producción de biopelícula utilizando los espectros de masas de diferentes especies bacterianas, lo que no generaría la información necesaria para realizar una identificación rápida de especies productoras de biopelícula y no productoras de biopelícula (Ozdikmenli Tepeli et al., 2023).

Se identificó la probable identidad peptídica de los picos biomarcadores potenciales de la resistencia antibióticos identificados en *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*. La literatura indica que la mayoría de picos presentes en los espectros de masas generados por MALDI-TOF pertenecen a proteínas ribosomales (Suarez et al., 2013), sin embargo, en este estudio la identidad peptídica encontrada no correspondió a proteínas ribosomales o relacionadas a la resistencia a antibióticos. Además, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, la literatura indica que un valor aceptable es $> 80\%$ (Plante & Vance, 1994), sin embargo, en este estudio no se encontró un pico biomarcador teórico con valores por encima de 80% en los 4 valores. Los picos biomarcadores potenciales encontrados solo cumplieron con un valor $> 80\%$ en 2 de los 4 de los valores calculados, esto nos sugiere que se debería realizar un estudio con una N mayor para determinar si estos probables picos biomarcadores pueden ser utilizados para la identificación de SARM, ERV y *P. aeruginosa* MDR.

Las bacterias con la capacidad de formar biopelícula son las responsables de la mayoría de las infecciones crónicas que llegan a durar décadas en los pacientes, y la mayoría de los estudios relacionados a cómo reacciona el sistema inmune a las infecciones bacterianas está enfocado a bacterias planctónicas. Por esta razón se evaluó la activación del sistema inmune *in vitro* en PBMC co-cultivadas con biopelículas maduras de 24 h de *S. aureus* resistentes a meticilina y *E. faecalis* resistentes a vancomicina. Se evaluó la viabilidad celular de las PBMC después de 24 h de co-cultivo, en este estudio se determinó que en SARM no había diferencias en la viabilidad comparado con las PBMC sin estímulo y estimuladas con ConA ($p < 0.05$), mientras que para ERV se observó una disminución en la viabilidad de PBMC co-cultivadas con bacterias planctónicas, sin embargo, no fue significativa ($p < 0.05$), similar a estos resultados, Kaya y colaboradores determinaron que

las PBMC co-cultivadas con bacterias planctónicas y biopelícula de *P. aeruginosa* y *S. epidermidis* no presentaban disminución en su viabilidad (Kaya et al., 2020, 2021). Otro grupo de trabajo realizó un estudio similar, y reportaron un 75,5 % de viabilidad en los co-cultivos de SARM con PBMC, en este estudio encontramos una viabilidad mayor, de aproximadamente el 80,0 % (Gheitasi et al., 2024). La disminución en la viabilidad con bacterias planctónicas de ERV podría deberse a una alta densidad de crecimiento bacteriano durante las 24 h de co-cultivo, porque, estudios han revelado que en la sangre se pueden identificar genes 16s que indicaría la presencia de bacterias, y se encontró que el 93,74 % de las bacterias presentes en la sangre completa se encontrarían en la capa leucocitaria; misma en donde podemos encontrar a las PBMC, esto indica que dichas células están en contacto con bacterias sin afectar su función o viabilidad (Païssé et al., 2016).

Posterior a observar que las PBMC presentaban viabilidad celular al ser co-cultivadas con bacterias planctónicas y biopelícula se evaluó si estas también eran activadas evaluando el marcador de activación temprana CD69. Se observó que los co-cultivos de 24 h SARM en estado planctónico y biopelícula presentaron activación celular comparado con las PBMC sin estímulo ($p < 0.0001$), sin embargo, entre co-cultivos no fue significativo ($p > 0.05$). Mientras que, las PBMC co-cultivadas con ERV planctónica fue la que presentó activación celular comparado con el co-cultivo con biopelícula de ERV y PBMC sin estímulo ($p < 0.01$). Kaya y colaboradores, reportaron que *P. aeruginosa* presentaba una activación similar en co-cultivos de PBMC con bacterias planctónicas y formando biopelícula ($p > 0.05$), mientras que en *S. epidermidis* se observó un aumento en la activación cuando las PBMC eran co-cultivadas con bacterias planctónicas. Las diferencias en cuanto a activación entre cepas bacterianas y tipo de co-cultivo lo atribuyen a la estructura tridimensional de la biopelícula, mencionan que *P. aeruginosa* tiene forma de torre u hongo y presentan canales a través de los que las PBMC podrían acceder al interior de la biopelícula e interactuar con las bacterias incrustadas dentro, mientras que *S. epidermidis* tiene una estructura compacta y plana lo que dificultaría la interacción PBMC-bacteria (Kaya et al., 2020, 2021). De manera similar, se ha descrito que *S. aureus* presenta estructura de torre u hongo, mientras que *E. faecalis* tiene forma compacta y

plana, esto indicaría que nuestros resultados de activación celular concuerdan a lo reportado en bacterias distintas pero con una estructura tridimensional similar a las evaluadas en este estudio (Peng et al., 2023; Rather et al., 2021).

Evaluar la secreción de las citocinas por las células del sistema inmune co-cultivadas con bacterias planctónicas o biopelícula es de gran importancia para conocer el estado inflamatorio inducido por las distintas fases bacterianas. Se ha reportado que en células de queratinocitos humanos estimuladas con bacterias planctónicas y biopelícula de *S. aureus* indujo una expresión mayor de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los co-cultivos de PBMC con biopelícula a las 4 h ($p < 0.01$), sin embargo, este efecto cambio a las 24 h de estímulo, encontrando una mayor secreción en el co-cultivo con bacterias planctónicas en IL-1 β e IL-6 ($p < 0.01$). Estos cambios se relacionaron a que a las 24 h comenzaría una apoptosis temprana lo que reduciría la expresión proteica (Secor et al., 2011). En nuestro estudio, evaluamos la secreción de citocinas en co-cultivos de PBMC con bacterias planctónica y biopelícula de SARM, encontramos que los niveles de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12p70 fueron mayores en PBMC estimuladas con biopelícula ($p < 0.05$), mientras que, TNF tuvo una mayor secreción cuando las PBMC estuvieron en contacto con biopelícula, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Similar a nuestros resultados, Gheitasi y colaboradores evaluaron la secreción de citocinas en co-cultivos de PBMC con SARM en estado planctónico y de biopelícula, determinaron que IL-8, IL-1 β e IL-6 tenían mayores niveles en las PBMC estimuladas con biopelícula, mientras que IL-12 y TNF fue mayor en las planctónicas, sin embargo, no existieron diferencias significativas en ninguna de estas citocinas proinflamatorias ($p > 0.05$). Las diferencias encontradas en lo reportado y nuestros resultados podría atribuirse a la cantidad de PMBC utilizadas, nosotros utilizamos 4×10^6 células/pocillo, mientras que, Gheitasi y colaboradores utilizaron 0.5×10^6 células/pocillo (Gheitasi et al., 2024).

En este estudio se observaron diferencias significativas en la secreción de IL-8, IL-1 β , IL-6 y TNF en los co-cultivos de PBMC estimuladas con *E. faecalis* biopelícula madura no tuvo diferencias, mientras que IL-10 e IL-12p70 presentaron un aumento significativo cuando las PBMC fueron estimuladas con la biopelícula de *E. faecalis* ($p < 0.05$). No

existen reportes donde se evalúe las diferencias en cuanto a secreción de citocinas en PBMC estimuladas con biopelícula de *E. faecalis*. Sparo y colaboradores evaluaron propiedades inmunomoduladoras de extractos de pared celular de *E. faecalis* CECT7121, reportaron que PBMC estimuladas con *E. faecalis* inactivada por calor y el extracto de la pared celular indujeron una mayor secreción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF que en el control sin estímulo y con LPS (Sparo et al., 2014), estos resultados no concuerdan con lo reportado en nuestro estudio debido a que encontramos que el co-cultivo con *E. faecalis* en estado planctónico indujo menor activación comparado con las PBMC sin estímulo, estimuladas con biopelícula y con ConA, la discrepancia puede deberse al estado en que se utilizó *E. faecalis* al momento de realizar los co-cultivos.

La biopelícula de *S. aureus* puede modificar el microambiente al unirse a una superficie e inducir una respuesta antiinflamatoria (IL-10) para favorecer su persistencia, mientras que el sistema inmunitario podría inducir una respuesta proinflamatoria (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12p70 y TNF) para iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa, sin embargo, algunos estudios han reportado que las bacterias tienen mayores UFC al ser co-cultivados con sobrenadantes obtenidos al estimular PBMC con bacterias planctónicas o de biopelícula, esto sugiere que las bacterias podrían reconocer la presencia de componentes inmunitarios del huésped y utilizarlos a su favor para promover su propia persistencia (Kaya et al., 2020, 2021; Scherr et al., 2014). La información sobre la respuesta inmune en contra de biopelícula de *E. faecalis* es escasa, algunos estudios han evaluado la actividad de algunas células del sistema inmune, han reportado que los monocitos infectados con biopelícula de *E. faecalis* inducen una menor secreción de citocinas proinflamatorias (Daw et al., 2012), esto concuerda con nuestros resultados al observar que es mayor la media de secreción de TNF- α en PBMC co-cultivadas con bacterias planctónicas, sin embargo, para IL-6 fue menor la secreción ($p > 0.05$).

Una limitación de este estudio es que no se realizaron pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para todas las bacterias aisladas de las infecciones asociadas a la atención médica entre 2019 y 2022. Dichas pruebas generalmente se solicitan cuando se sospecha un patógeno específico en función de las manifestaciones clínicas, en lugar de por

colonización o contaminación (Bayot & Bragg, 2021). Además, el enfoque en el diagnóstico y tratamiento del SARS-CoV-2 durante la pandemia puede haber contribuido a la disminución observada en el aislamiento de la cepa ESKAPE (Mirzaei et al., 2020).

9 Conclusiones

Durante el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2019 y el 31 de diciembre de 2022, se identificaron 3,196 IAAS en un hospital de tercer nivel del noreste de México. Las especies bacterianas más prevalentes fueron *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, que en conjunto representaron más del 75 % de los aislamientos clínicos. En particular, en el área COVID-19 y la UCI, se observaron diferencias en la distribución de especies, siendo *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* las más frecuentes en área COVID-19, mientras que *A. baumannii* predominó en UCI.

De 1,488 aislamientos de IAAS analizados, 458 cepas (30.8 %) fueron resistentes a antibióticos y clasificadas dentro del grupo ESKAPE. La resistencia más frecuente correspondió a ABRC, que representó el 49.1 % de los casos.

A través del análisis de espectros de masas MALDI-TOF y el uso del software ClinProTools, se identificaron cinco picos potenciales como biomarcadores de resistencia en *Enterococcus* spp., cuatro en *S. aureus* y cuatro en *P. aeruginosa*. Los mejores candidatos, por sus valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, fueron los picos 3,788.51, 5,221.62 y 5,263.24 m/z en *Enterococcus* spp. y 6,579.99 m/z en *S. aureus*. En contraste, no se identificaron picos biomarcadores diferenciadores para la producción de biopelícula en cepas Gram positivas.

La evaluación fenotípica reveló que 5 de los 14 aislamientos de ERV y 11 de los 24 SARM fueron productores de biopelícula, en su mayoría con intensidad débil o moderada. Sin embargo, el análisis espectral no permitió distinguir entre cepas productoras y no productoras, y el análisis de componentes principales no mostró agrupamientos diferenciales.

En los ensayos funcionales con PBMC, se observó que el co-cultivo con biopelículas y formas planctónicas de SARM no afectó la viabilidad celular, mientras que las formas planctónicas de ERV indujeron una ligera disminución, aunque sin significancia estadística. En cuanto a la activación celular, SARM en ambos estados morfológicos

indujo una activación significativa de PBMC ($p < 0.0001$), sin diferencias entre formas planctónicas y biopelícula. En contraste, las formas planctónicas de ERV mostraron mayor capacidad de activación en comparación con la biopelícula ($p = 0.017$).

Finalmente, los análisis de expresión de citocinas revelaron que el co-cultivo con biopelículas de SARM indujo una mayor secreción de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 y IL-12p70, con significancia estadística en todos los casos excepto para TNF- β ($p > 0.999$). En ERV, la secreción de IL-10 e IL-12p70 fue significativamente mayor en las condiciones planctónicas, mientras que IL-8, IL-1 β , IL-6 y TNF no presentaron diferencias significativas entre ambos estados.

Estos hallazgos destacan la alta prevalencia de bacterias multirresistentes en IAAS, así como el valor potencial de los perfiles proteicos como herramienta complementaria para el diagnóstico de resistencia antimicrobiana. Además, se resalta la importancia del estado morfológico de las bacterias (planctónico o biopelícula) en la modulación de la respuesta inmunitaria *in vitro*, lo que podría tener implicaciones en el diseño de estrategias terapéuticas e inmunomoduladoras.

10 Perspectivas

- Diseñar una metodología para la búsqueda de picos biomarcadores potenciales para la característica de producción de biopelícula. Las bacterias se encontraban en fase planctónica al momento de identificarlos en el MALDI-TOF, esta podría ser la razón de no encontrar diferencias entre los grupos productores y no productores de biopelícula.
- Determinar las subpoblaciones celulares a las 24 h de co-cultivo de PBMC estimuladas con bacterias planctónicas y biopelículas maduras.
- Evaluar si las PBMC logran ingresar a la biopelícula madura mediante Microscopía Laser Confocal. Observando los distintos planos con el microscopio podríamos determinar si las PBMC logran ingresar a la biopelícula, así como también estimar la cantidad de células que interactúan con las bacterias.

11 Bibliografía

- Abd El-hamid, M. I., Y. El-Naenaeey, E., M Kandeel, T., Hegazy, W. A. H., Mosbah, R. A., Nassar, M. S., Bakhrebah, M. A., Abdulaal, W. H., Alhakamy, N. A., & Bendary, M. M. (2020). Promising Antibiofilm Agents: Recent Breakthrough against Biofilm Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(667).
- Awuor, S. O., Omwenga, E. O., Mariita, R. M., Musila, J. M., & Musyoki, S. (2023). Monitoring the battleground: exploring antimicrobial resistance and virulence factors in wound bacterial isolates. *Access Microbiology*, 5(11). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000613.v6>
- Ayobami, O., Brinkwirth, S., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2022a). Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 443–451. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030196>
- Ayobami, O., Brinkwirth, S., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2022b). Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 443–451.
- Barchitta, M., Maugeri, A., Favara, G., San Lio, R. M., La Rosa, M. C., D'Ancona, F., & Agodi, A. (2023). The intertwining of healthcare-associated infections and COVID-19 in Italian intensive care units: an analysis of the SPIN-UTI project from 2006 to 2021. *Journal of Hospital Infection*, 140, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.07.021>
- Bartal, C., Rolston, K. V. I., & Nesher, L. (2022). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Colonization, Infection and Current Treatment Options. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(2), 683–694. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00597-w>

Bayot, M. L., & Bragg, B. N. (2021). Antimicrobial susceptibility testing. In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>

Bentivegna, E., Luciani, M., Arcari, L., Santino, I., Simmaco, M., & Martelletti, P. (2021). Reduction of multidrug-resistant (Mdr) bacterial infections during the covid-19 pandemic: A retrospective study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1–8. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031003>

Calderaro, A., & Chezzi, C. (2024). MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020322>

Caputo, P., Di Martino, M. C., Perfetto, B., Iovino, F., & Donnarumma, G. (2018). Use of MALDI-TOF MS to discriminate between biofilm-producer and non-producer strains of *staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph15081695>

Cerone, A., & Marsili, E. (2021). A Formal Model for the Simulation and Analysis of Early Biofilm Formation. *Springer International Publishing, Revised Se*(9), 134–151. https://doi.org/10.1007/978-3-030-70650-0_9

Church, D. L., Cerutti, L., Gürler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the. *American Society for Microbiology*, 33(4), 1–74.

Ciornei, C. D., Novikov, A., Beloin, C., Fitting, C., Caroff, M., Ghigo, J. M., Cavaillon, J. M., & Adib-Conquy, M. (2010). Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immunity*, 16(5), 288–301. <https://doi.org/10.1177/1753425909341807>

CLSI. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI 67

supplement M100 (33rd ed.).

Cole, J., & Barnard, E. (2021). The impact of the COVID-19 pandemic on healthcare acquired infections with multidrug resistant organisms. *American Journal of Infection Control*, 49(5), 653–654. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.09.013>

Dadi, N. C. T., Radochová, B., Vargová, J., & Bujdáková, H. (2021). Impact of healthcare-associated infections connected to medical devices—an update. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112332>

Daw, K., Baghdayan, A. S., Awasthi, S., & Shankar, N. (2012). Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes in vitro. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(2), 270–282. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00944.x>

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

Durán-Manuel, E. M., Cruz-Cruz, C., Ibáñez-Cervantes, G., Bravata-Alcántara, J. C., Sosa-Hernández, O., Delgado-Balbuena, L., León-García, G., Cortés-Ortíz, I. A., Cureño-Díaz, M. A., Castro-Escarpulli, G., Vélez-Reséndiz, J. M., & Bello-López, J. M. (2021). Clonal dispersion of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit designed to patients COVID-19. *Journal of Infection in Developing Countries*, 15(1), 58–68. <https://doi.org/10.3855/jidc.13545>

Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>

Eichel, V. M., Last, K., Brühwasser, C., von Baum, H., Dettenkofer, M., Götting, T., Grundmann, H., Güldenhoven, H., Liese, J., Martin, M., Papan, C., Sadaghiani, C., Wendt, C., Werner, G., & Mutters, N. T. (2023). Epidemiology and outcomes of

vancomycin-resistant enterococcus infections: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hospital Infection*, 141, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.09.008>

Faron, M. L., Ledeboer, N. A., & Buchan, B. W. (2016). Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant Enterococcus in the health care setting. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(10), 2436–2447. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-16>

Flores-Treviño, S., Garza-González, E., Mendoza-Olazarán, S., Morfín-Otero, R., Camacho-Ortiz, A., Rodríguez-Noriega, E., Martínez-Meléndez, A., & Bocanegra-Ibarias, P. (2019). Screening of biomarkers of drug resistance or virulence in ESCAPE pathogens by MALDI-TOF mass spectrometry. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55430-1>

Florio, W., Baldeschi, L., Rizzato, C., Tavanti, A., Ghelardi, E., & Lupetti, A. (2020). Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572909>

Freire, M. P., de Assis, D. B., Tavares, B. de M., Brito, V. O. C., Marinho, I., Lapchik, M., Guedes, A. R., Madalosso, G., Oliveira, M. S., de Lima, A. C. P., & Levin, A. S. (2023). Impact of COVID-19 on healthcare-associated infections: Antimicrobial consumption does not follow antimicrobial resistance. *Clinics*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2023.100231>

Fujiya, Y., Harada, T., Sugawara, Y., Akeda, Y., Yasuda, M., Masumi, A., Hayashi, J., Tanimura, N., Tsujimoto, Y., Shibata, W., Yamaguchi, T., Kawahara, R., Nishi, I., Hamada, S., Tomono, K., & Kakeya, H. (2021). Transmission dynamics of a linear vanA-plasmid during a nosocomial multiclonal outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a non-endemic area, Japan. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94213-5>

Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sánchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>

Gedefie, A., Demsis, W., Ashagrie, M., Kassa, Y., Tesfaye, M., Tilahun, M., Bisetegn, H., & Sahle, Z. (2021). *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: A review. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3711–3719. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332051>

Gheitasi, R., Röll, D., Müller, M. M., Naseri, M., König, R., Slevogt, H., Pletz, M. W., & Makarewicz, O. (2024). Exploring secretory proteome and cytokine kinetic of human peripheral blood mononuclear cells exposed to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and planktonic bacteria. *Frontiers in Immunology*, 15(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1334616>

Giamarellos-Bourboulis, E. J., & Raftogiannis, M. (2012). The immune response to severe bacterial infections: Consequences for therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(3), 369–380. <https://doi.org/10.1586/eri.12.2>

Goelz, H., & Kuofie, M. (2020). Healthcare Associated Infections. *International Journal of Health and Economic Development*, 6(1), 7–14, January 2020 7 *Healthcare*, 6(1), 7–14.

Grande, R., Puca, V., & Muraro, R. (2020). Antibiotic resistance and bacterial biofilm. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(12), 897–900. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1830060>

Guffey, A. A., & Loll, P. J. (2021). Regulation of resistance in vancomycin-resistant enterococci: The vanRS two-component system. *Microorganisms*, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102026>

Halebeedu, P. P., Vijay Kumar, G. S., & Gopal, S. (2014). Revamping the role of biofilm regulating operons in device-associated Staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32(2), 112–123. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.129766>

Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4), 272–275. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>

Huerta-Gutiérrez, R., Braga, L., Camacho-Ortiz, A., Díaz-Ponce, H., García-Mollinedo, L., Guzmán-Blanco, M., Valderrama-Beltrán, S., Landaeta-Nezer, E., Moreno-Espinosa, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Zulueta, P., Rosado-Buzzo, A., Rosso-Suárez, F., Trindade-Clemente, W., & Wiltgen, D. (2019). One-day point prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in four countries in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 86, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.06.016>

Idris, F. N., & Nadzir, M. M. (2023). Multi-drug resistant ESKAPE pathogens and the uses of plants as their antimicrobial agents. In *Archives of Microbiology* (Vol. 205, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03455-6>

Ioannou, P., Vamvoukaki, R., & Kofteridis, D. P. (2021). Infective endocarditis by *Enterobacter cloacae*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Chemotherapy*, 34(1).

Jabbari Shiadeh, S. M., Pormohammad, A., Hashemi, A., & Lak, P. (2019). Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *enterococcus faecalis* and *enterococcus faecium*: A systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug*

Resistance, 12, 2713–2725. <https://doi.org/10.2147/IDR.S206084>

Karampatakis, T., Tsergouli, K., & Behzadi, P. (2023). Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics*, 12(234). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020234>

Kaya, E., Batoni, G., Di Luca, M., Apolloni, E., Mazzoni, A., Maisetta, G., & Esin, S. (2021). Planktonic and biofilm-associated *pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus epidermidis* elicit differential human peripheral blood cell responses. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091846>

Kaya, E., Grassi, L., Benedetti, A., Maisetta, G., Pileggi, C., Di Luca, M., Batoni, G., & Esin, S. (2020). In vitro Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms With Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00187>

Krawczyk, B., Wityk, P., Gałecka, M., & Michalik, M. (2021). The many faces of *enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 9(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>

Kunz Coyne, A. J., El Ghali, A., Holger, D., Rebold, N., & Rybak, M. J. (2022). Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(2), 661–682. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00591-2>

Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, 10(373). <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>

Lade, H., & Kim, J. S. (2023). Molecular Determinants of β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091362>

- Lai, C. C., Chen, S. Y., Ko, W. C., & Hsueh, P. R. (2021). Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106324>
- Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(May), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Li, G., Walker, M. J., & De Oliveira, D. M. P. (2023). Vancomycin Resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010024>
- Ma, J., Song, X., Li, M., Yu, Z., Cheng, W., Yu, Z., Zhang, W., Zhang, Y., Shen, A., Sun, H., & Li, L. (2023). Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiological Research*, 266(October 2022), 127249. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127249>
- Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18), 3057–3071. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, 10(1310).
- Maree, M., Thi Nguyen, L. T., Ohniwa, R. L., Higashide, M., Msadek, T., & Morikawa, K. (2022). Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Nature Communications*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29877-2>
- Marekovic, I., Markanovic, M., Lešin, J., & Coric, M. (2024). Vancomycin-Resistant Enterococci : Current Understandings of Resistance in Relation to Transmission and Preventive Strategies. *Pathogens*, 13(966).

Mirzaei, R., Goodarzi, P., Asadi, M., Soltani, A., Aljanabi, H. ali abraham, Jeda, A. S., Dashtbin, S., Jalalifar, S., Mohammadzadeh, R., Teimoori, A., Tari, K., Salari, M., Ghiasvand, S., Kazemi, S., Yousefimashouf, R., Keyvani, H., & Karampoor, S. (2020). Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*, 72(10), 2097–2111. <https://doi.org/10.1002/iub.2356>

Moser, C., Pedersen, H. T., Lerche, C. J., Kolpen, M., Line, L., Thomsen, K., Høiby, N., & Jensen, P. Ø. (2017). Biofilms and host response – helpful or harmful. *Apmis*, 125(4), 320–338. <https://doi.org/10.1111/apm.12674>

Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539.

Mulet, X., Fernández-Esgueva, M., Norte, C., Zamorano, L., Del Barrio-Tofiño, E., & Oliver, A. (2021). No TValidation of MALDI-TOF for the early detection of the ST175 high-risk clone of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical isolates belonging to a Spanish nationwide multicenter study. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*, 39(6), 279–282.

Murphy, J. T., & Wallshe, R. (2011). Modelling Antibiotic Resistance in Bacterial Colonies Using Agent-Based Approach. In *Understanding the Dynamics of Biological Systems: Lessons Learned from Integrative Systems Biology* (pp. 131–154).

Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., & Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative

Review. *Pharmaceuticals*, 16(11), 1–54. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>

Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>

Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450–460. <https://doi.org/10.1093/jac/dki492>

Ozdikmenli Tepeli, S., Numanoglu Cevik, Y., Nur Tosun, M., Taylan Yalcin, G., Kaya, B., Ipek, D., Bakkaloglu, Z., Simsek, H., & Nilufer Zorba, N. (2023). Carbapenem resistance and biofilm formation status of Enterobacteriales isolated from raw milk via molecular versus phenotypic methods. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 116(1), 67–80.

Ozuna, M. P., Delgadillo Vester, L., & Jiménez, J. (2019). Implementación de medidas preventivas de las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud (IAAS) en un departamento de cuidados intensivos pediátricos. *Revista Científica Ciencias de La Salud*, 1(2), 8–18. <https://doi.org/10.53732/rccsalud/01.02.2019.08>

Paes Leme, R. C., Martins Bispo, P. J., & Salles, M. J. (2021). Community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Latin America: a systematic review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 25(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101539>

Païssé, S., Valle, C., Servant, F., Courtney, M., Burcelin, R., Amar, J., & Lelouvier, B. (2016). Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*, 56(5), 1138–1147. <https://doi.org/10.1111/trf.13477>

Pandey, R., Mishra, S. K., & Shrestha, A. (2021). Characterisation of eskape pathogens with special reference to multidrug resistance and biofilm production in a nepalese

hospital. *Infection and Drug Resistance*, 14, 2201–2212.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S306688>

Peacock, S. J., & 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>

Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N., & Yuan, W. (2023). A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics*, 12(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>

Pereira, F. D. E. S., Bonatto, C. C., Lopes, C. A. P., Pereira, A. L., & Silva, L. P. (2015). Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces. *Microbial Pathogenesis*, 86, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.005>

Plante, E., & Vance, R. (1994). Selection of Preschool Language Tests: A Data-Based Approach. *Language, Speech, and Hearing Services in Schools*, 25(1), 15–24.
<https://doi.org/10.1044/0161-1461.2501.15>

Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>

Revelas, A. (2012). Healthcare - associated infections: A public health problem. *Nigerian Medical Journal*, 53(2), 59. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.103543>

Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131.
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>

Sabença, C., De Sousa, T., Oliveira, S., Viala, D., Théron, L., Chambon, C., Hébraud, M., Beyrouthy, R., Bonnet, R., Caniça, M., Poeta, P., & Igrejas, G. (2020). Next-

Generation Sequencing and MALDI Mass Spectrometry in the Study of Multiresistant Processed Meat Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biology*, 9(89), 1–17.

Salmanov, A., Shchehlov, D., Svyrydiuk, O., Bortnik, I., Mamonova, M., Korniyenko, S., Rud, V., Artyomenko, V., Gudym, M., Maliarchuk, R., & Bondar, T. (2023). Epidemiology of healthcare-associated infections and mechanisms of antimicrobial resistance of responsible pathogens in Ukraine: a multicentre study. *The Journal of Hospital Infection*, 131, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.10.007>

Sameen, R., Bindurshree, V., Sharma, K., Vasudevan, V., Devaraj, Shri Hari, T., & Mathew, N. S. (2005). Administrative Role of Dentist in Antibiotics Against Antibiotic Resistance in Present Scenario!!!-A Narrative Review. *Journal of Oral Health & Dentistry JOHD*, 3(2), 212–218. www.scitcentral.com

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

Scherr, T. D., Heim, C. E., Morrison, J. M., & Kielian, T. (2014). Hiding in plain sight: Interplay between staphylococcal biofilms and host immunity. *Frontiers in Immunology*, 5(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00037>

Secor, P. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, J. E., McInnerney, K., & Stewart, P. S. (2011). Staphylococcus aureus Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-143>

Shridhar, S., & Dhanashree, B. (2019). Antibiotic Susceptibility Pattern and Biofilm Formation in Clinical Isolates of Enterococcus spp. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2019(December 2016). <https://doi.org/10.1155/2019/7854968>

Sparo, M., Delpech, G., Batistelli, S., & Basualdo, J. Á. (2014). Immunomodulatory

properties of cell wall extract from *Enterococcus faecalis* CECT7121. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(5), 551–555.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.05.005>

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. *All Rights Reserved Journal Compilation C*, 115, 891–900.

Suarez, S., Ferroni, A., Lotz, A., Jolley, K. A., Guérin, P., Leto, J., Dauphin, B., Jamet, A., Maiden, M. C. J., Nassif, X., & Armengaud, J. (2013). Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 390–396.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.021>

Tabak, Y. P., Merchant, S., Ye, G., Vankeepuram, L., Gupta, V., Kurtz, S. G., & Puzniak, L. A. (2019). Incremental clinical and economic burden of suspected respiratory infections due to multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Journal of Hospital Infection*, 103(2), 134–141.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.06.005>

Tolker-Nielsen, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *Apmis*, 122(s138), 1–51.
<https://doi.org/10.1111/apm.12335>

Tsuchida, S., & Nakayama, T. (2022). MALDI-Based Mass Spectrometry in Clinical Testing: Focus on Bacterial Identification. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(6).
<https://doi.org/10.3390/app12062814>

Tuhamize, B., & Bazira, J. (2024). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the livestock, humans and environmental samples around the globe: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-1598-1>

Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>

Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>

Váradi, L., Luo, J. L., Hibbs, D. E., Perry, J. D., Anderson, R. J., Orenga, S., & Groundwater, P. W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, 46(16), 4818–4832. <https://doi.org/10.1039/c6cs00693k>

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>

Vrioni, G., Tsiamis, C., Oikonomidis, G., Theodoridou, K., Kapsimali, V., & Tsakris, A. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 240–240. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.06.28>

Wang, H.-Y., Chung, C.-R., Chen, C.-J., Lu, K.-P., Tseng, Y.-J., Chang, T.-H., Wu, M.-H., Huang, W.-T., Lin, T.-W., Liu, T.-P., Lee, T.-Y., Horng, J.-T., & Lu, J.-J. (2021).

Clinically Applicable System for Rapidly Predicting *Enterococcus faecium* Susceptibility to Vancomycin. *Microbiology Spectrum*, 9(3).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.00913-21>

Yu, J., Tien, N., Liu, Y.-C., Cho, D.-Y., Chen, J.-W., Tsai, Y.-T., Huang, Y.-C., Chao, H.-J., & Chen, C.-J. (2022). Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using MALDI-TOF MS and Machine Learning from over. *Microbiology Spectrum*, 10(2), 1–10.