



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fci.en.edu.uy



Ministerio
de Educación
y Cultura



iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



ih
INSTITUTO DE HIGIENE
Prof. Aronoldo Bortz
FACULTAD DE MEDICINA



PEDECIBA
MEC-UDELAR

Biofilms y su vinculación en infecciones de prótesis articulares de cadera.

Lic. Natalia Reyes Cáceres

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología, orientación Microbiología

Montevideo- Uruguay
07 de Setiembre de 2023



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Ministerio
de Educación
y Cultura



iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



ih
INSTITUTO DE HIGIENE
Prof. Aronoldo Barcia
FACULTAD DE MEDICINA



PEDECIBA
MEC-UDELAR

Biofilms y su vinculación en infecciones de prótesis articulares de cadera.

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Pedeciba, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Biología

Directora de tesis:

PhD. Paola Scavone

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente

Estable, Ministerio de Educación y Cultura

Laboratorio de Biofilms Microbianos, Departamento de Microbiología

Co-directora:

Dra. PhD. Luciana Robino

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

Departamento de Bacteriología y Virología

Integrantes del Tribunal

Presidente: Dra. Lucía Yim.

Vocales: Dres. Carolina Márquez y Gustavo Varela.

Agradecimientos

A mis orientadoras Luciana y Paola por acompañar este proceso, al Laboratorio del Departamento de Microbiología (IIBCE) y al Laboratorio del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. Gracias Aracé Martínez por ayudarme a trabajar con el MALDI-TOF, por explicar con amor y paciencia todo lo que me generaba dudas, por pasar las muestras las veces que fuera necesario. A Lore Pardo por la buena onda siempre, por tu generosidad, por tu compañerismo, por hacerme parte de tu equipo desde el minuto uno. Gracias Andrés Parnizari por ayudar siempre, por decir a todo sí, por trabajar fuerte conmigo incluso a la distancia. Gracias Javier Lenzi por la ayuda en general, pero sin dudas tu ayuda en el análisis estadístico fue salvadora, gracias por dedicar tanto tiempo y esfuerzo a este trabajo, siempre con buena onda, siempre con un sí.

Agradecer también al Banco de Prótesis de Uruguay por colaborar con las muestras clínicas, al Dr. Justino Menendez y equipo.

Agradecer a la familia y a los amigos que en realidad son familia.

Y por último agradecer mis dos compañeros de vida, que apoyan y acompañan cada desafío siempre, y que han hecho que esta etapa sea mucho más fácil.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Importancia y epidemiología de las infecciones de prótesis de cadera	3
1.2 Biofilms: definiciones y mecanismos de tolerancia a los antibióticos	5
1.3 Métodos de estudio microbiológicos para el aislamiento de microorganismos en prótesis de cadera	10
1.4 Agentes etiológicos	11
1.4.1 Principales características de <i>Staphylococcus</i> spp.	12
1.4.2 Principales factores de virulencia de <i>Staphylococcus</i> spp.	13
1.4.3 Resistencia antibiótica en <i>Staphylococcus</i> spp.	15
1.5 Medidas de prevención y tratamientos sugeridos para infecciones en prótesis de cadera	19
1.6 Problema de investigación	21
2. Hipótesis de trabajo.....	21
2.1 Predicciones	21
3. Objetivo general.....	22
3.1 Objetivos específicos	22
4. Metodología.....	23
4.1 Población de estudio	23
4.2 Aspectos éticos	23
4.3 Aspectos técnicos.....	23
4.3.1 Recuperación bacteriana	24
4.3.2 Análisis de la formación de biofilm sobre la prótesis de cadera.....	26
4.3.3 Identificación de los agentes etiológicos.....	27
4.3.4 Almacenamiento de las cepas	28
4.3.5 Cuantificación de la biomasa de biofilms <i>in vitro</i>	28
4.3.6 Susceptibilidad antibiótica en células planctónicas	30
4.3.7 Efecto de los antibióticos sobre la inhibición en la formación de biofilms <i>in vitro</i>	31
4.3.8 Búsqueda de genes que codifican para factores de virulencia en <i>Staphylococcus</i> spp.	33
4.3.8.1 Extracción de ácidos nucleicos	33
4.4 Análisis de datos	35
5. Resultados	36

5.1 Aislamiento e identificación bacteriana a partir de prótesis articulares	36
5.2 Detección de biofilm utilizando Cristal Violeta sobre la prótesis articular	38
5.3 Determinación de la capacidad formadora de biofilm de las bacterias aisladas... 40	
5.3.1 Modelo estático de formación de biofilm sobre placa de microtitulación	40
5.4 Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas.....	43
5.5 Efecto de los distintos antibióticos sobre la formación de biofilms	46
5.6 Búsqueda de distintos factores de virulencia en <i>Staphylococcus spp.</i> por PCR en tiempo final	49
6. Discusión.....	51
7. Conclusiones.....	61
8. Perspectivas	62
9. Bibliografía.....	63
10. Material suplementario	81

Resumen

Las infecciones asociadas a prótesis articular son un problema sanitario y también económico para los sistemas de salud. Las complicaciones de dichas infecciones derivan en la remoción del dispositivo médico, lo que afecta al paciente aumentando el período de internación y posterior recuperación. Esta situación incrementa los gastos en el sistema de salud. Los principales agentes etiológicos responsable de dichas infecciones pertenecen al género *Staphylococcus* spp., destacándose *S. aureus* y *S. epidermidis*. Sin embargo, existen más patógenos involucrados en estas infecciones. Estos microorganismos pueden adherirse a la superficie de la prótesis y formar biofilms. A su vez los microorganismos poseen factores de virulencia que están vinculados con la formación de biofilm lo que podría contribuir aún más con dicha formación. Tanto la formación de biofilm como la expresión de distintos factores de virulencia en las cepas aisladas de estos pacientes podrían contribuir con los fracasos en los tratamientos antibióticos. El objetivo general consistió en identificar los agentes etiológicos y caracterizar su capacidad de formar biofilms *in vitro*, así como la efectividad de distintos antimicrobianos para inhibir la formación de biofilms. Además, se evaluó la presencia de genes de virulencia y su potencial asociación con la formación de biofilms y resistencia antibiótica. Veintiuna prótesis de cadera removidas en el Banco de Prótesis de Uruguay fueron evaluadas en el período comprendido entre 2019-2021. Dichos dispositivos fueron extraídos de pacientes con sospecha de infección, de acuerdo al criterio clínico del equipo médico tratante. El análisis de biofilms *in situ* sobre las prótesis mostró que 14 de las 21 (66%) poseían biofilms observables macroscópicamente por la tinción con cristal violeta. Las prótesis fueron sometidas a sonocado como método de desprendimiento bacteriano del biofilm. En 71.4 % de las prótesis estudiadas se obtuvo crecimiento bacteriano. Las bacterias del género *Staphylococcus* spp. fueron los agentes etiológicos aislado con mayor frecuencia (75%), siendo *S. aureus* y *S. epidermidis* las especies identificadas (37.5% respectivamente). En cuanto a la formación de biofilm *in vitro* de los microorganismos aislados, se observó que el 94% de las cepas recuperadas (13/14) poseen fuerte capacidad de formar biofilm. El estudio de susceptibilidad antibiótica y la evaluación de la capacidad inhibitoria de distintos antimicrobianos sobre el crecimiento de los biofilms *in vitro* se realizó con los

aislamientos de *Staphylococcus* spp. La susceptibilidad antibiótica fue del 100% para vancomicina, y la mayor resistencia antibiótica fue con gentamicina en el 70% de las cepas analizadas. Los ensayos de inhibición del biofilm mostraron que vancomicina es el antibiótico con mayor efecto, seguido por ciprofloxacina y gentamicina. Por otro lado, clindamicina no mostró inhibición de la formación del biofilm. En cuanto a la presencia de los genes de virulencia, todas las cepas tuvieron la presencia de al menos un factor. En 9 de las 10 cepas analizadas se destaca la presencia de proteínas de unión a la fibronectina (FnBPs), proteínas que promueven la adhesión. En 8 de las cepas analizadas se detectó la combinación de entre 4 y 7 genes de virulencia que además de incluir a los *fnbPs*, contiene genes del operón *ica* y el factor clumping ClfA también vinculados con la adhesión, a su vez también cuenta con la presencia del factor SodA que presenta la capacidad de contrarrestar la acción de los radicales libres una vez que las bacterias son fagocitadas. De este trabajo se concluye que más de la mitad de las prótesis de cadera (66%) removidas en el Banco de prótesis de Uruguay en el período comprendido entre 2019-2021, presentaron biofilms asociados a la superficie. El sonicado como método de recuperación bacteriana permitió el aislamiento de microorganismos en la mayoría de las prótesis de cadera analizadas. Los microorganismos adheridos a las prótesis articulares poseen fuerte capacidad formadora de biofilms y los agentes etiológicos detectados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* y *S. epidermidis*. El tratamiento con vancomicina inhibió el desarrollo de células planctónicas, ya que todas las cepas analizadas fueron sensibles. La eficacia del tratamiento antibiótico de biofilms *in vitro* varió de acuerdo con el tipo de antibiótico y su concentración. La vancomicina fue el antibiótico más efectivo en reducir la formación de biofilms *in vitro*. Los genes vinculados con la unión a la fibronectina A y B (*fnbAB*) fueron los genes de virulencia mayormente encontrados. Debido a la escasa información vinculada a este tipo de infecciones en nuestro país, es relevante contribuir con esta problemática. Documentar la vigilancia de los principales agentes etiológicos responsables de las infecciones en prótesis de cadera en Uruguay. Analizar la sensibilidad antibiótica *in vitro* de los biofilms formados por esos agentes etiológicos, desafiados con un pool de antibióticos, podría brindar información de relevancia. Esta información podría contribuir con el abordaje terapéutico para mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento. Con el objetivo de evitar la remoción de la prótesis y por tanto la reintervención quirúrgica del paciente, así como minimizar el impacto económico negativo que estas infecciones generan en el sistema de salud.

1. Introducción

1.1 Importancia y epidemiología de las infecciones de prótesis de cadera

Las artroplastias articulares han supuesto uno de los avances sanitarios con mayor relevancia en las últimas décadas a nivel mundial (Davis et al., 2022; Learmonth et al., 2007). Actualmente es una intervención quirúrgica muy frecuente y eficaz para restablecer la función articular (Ariza et al., 2008; Darouiche, 2001; Le Vavasseur & Zeller, 2022; Zeller et al., 2018). En Francia se realizan cerca de 200.000 cirugías de prótesis totales de cadera al año. Se calcula que al 2050, esta cifra aumentará entre un 42% y un 112.3% (Le Vavasseur & Zeller, 2022). Sin embargo, esta cirugía también conlleva riesgos, entre los que la infección de la articulación protésica es el más grave con una elevada carga económica y humana (Davis et al., 2022; Hebert et al., 1996; Kapadia et al., 2016; Le Vavasseur & Zeller, 2022). En Francia la tasa de infección es del 0.5-2% en las prótesis primarias de cadera (reemplazo total o parcial de la articulación natural por la implantación de una prótesis de cadera artificial) y puede alcanzar hasta el 15% en cirugías de revisión (reintervención por sospecha de infección por fallo mecánico para el recambio de una prótesis de cadera artificial por otra prótesis de cadera artificial) (Le Vavasseur & Zeller, 2022).

Generalmente e incluso teniendo en cuenta la profilaxis y la técnica quirúrgica aséptica, el porcentaje de infecciones de prótesis articular tras una intervención no disminuye por debajo del 1-2%, dependiendo de la localización del hueso o la articulación (Lamret et al., 2020). Dichas infecciones requieren ser tratadas con antibióticos y en muchos casos las prótesis deben ser removidas cuando el tratamiento antibiótico no es efectivo (Hamad et al., 2015). En Estados Unidos el costo anual del tratamiento de infecciones de prótesis articulares en hospitales ha aumentado de 320 millones de dólares a 566 millones de dólares en un período de 8 años (Akanda et al., 2018). Lo que supone para todos los centros de atención hospitalarios un gran problema a mitigar. La probabilidad de necesitar una artroplastia de cadera aumenta con la edad, y empeora el pronóstico en pacientes con comorbilidades. En países con una alta proporción de la población envejecida, esto preocupa aún más (Lamret et al., 2020). Por

lo tanto, los profesionales de la salud y comunidad científica deberían incrementar sus esfuerzos para controlar estas infecciones (Cross et al., 2014).

En Uruguay la información vinculada a la artroplastia de cadera es muy escasa y esta desactualizada. Esta cirugía realizada de forma precoz permite una rápida movilización del paciente y un importante descenso de la mortalidad temprana (www.fnr.gub.uy). Sin embargo, dadas las características de la población que se somete a este procedimiento (generalmente de edad avanzada y frecuentemente en asociación con comorbilidades), la mortalidad postoperatoria se mantiene elevada (www.fnr.gub.uy). Las artroplastias de cadera se realizan en 6 centros, Institutos de Medicina Altamente Especializados (IMAE), y son financiadas por el Fondo Nacional de Recursos. En el período comprendido entre 2018-2021 se realizaron un total de 18.996 actos traumatológicos, de los cuales 11.438 fueron artroplastias de cadera (por artrosis, fractura o recambio) (www.fnr.gub.uy). El Banco de Prótesis de Uruguay realizó 5.892 de esas cirugías en dicho período (<http://www.fnr.gub.uy/estadisticas>). En el año 2021 el Banco de Prótesis de Uruguay fue el segundo prestador de salud con más artroplastias de cadera realizadas de los 6 centros IMAE del país (<http://www.fnr.gub.uy/estadisticas>).

Un reporte del Fondo Nacional de Recursos (Albornoz et al., 2009), indicó que en un estudio realizado entre noviembre de 2004 y febrero de 2005, en los distintos IMAE, de un total de 845 pacientes sometidos a cirugía de origen traumatológico (cirugías de cadera y rodilla) fallecieron 15 (1.8%). Tanto la mortalidad como la proporción de pacientes que desarrollaron infecciones luego de ser intervenidos quirúrgicamente son mayores en cirugías de cadera que de rodilla y fue similar entre los distintos IMAE.

Otro estudio realizado entre 2006-2019 en 7 grandes Instituciones de América del Norte, América del Sur y Europa donde incluyen a Uruguay, describe a *S. aureus* (24.8%) y *S. epidermidis* (21.7%) como los agentes etiológicos mayoritariamente causantes de infecciones en prótesis articulares de cadera y rodilla. Datos de Uruguay reportados por un único prestador de salud (Hospital Asociación Española de Montevideo) muestran a *S. aureus* como agente etiológico de estas infecciones en un 34.6%. La tasa de resistencia para algún antimicrobiano es del 78.5% para cirugías de cadera y del 54.1% para cirugías de rodilla (Villa et al., 2021). Además, se desprende de este trabajo que la frecuencia de infecciones causadas en nuestro país, por más de un patógeno fue del 6.5% para prótesis de cadera, mientras que para prótesis de rodilla fue del 0% (Villa et al., 2021).

1.2 Biofilms: definiciones y mecanismos de tolerancia a los antibióticos

Uno de los problemas relacionados a las infecciones asociadas a los implantes suelen ser el fracaso al tratamiento antibiótico vinculado a la formación de biofilms (Darouiche, 2004). Asumir que los patógenos identificados actúan como microorganismos independientes tiene como consecuencia el planteo de un tratamiento dirigido a células planctónicas en vez de estar dirigido a los biofilms y esto reduciría la efectividad de los tratamientos (March Roselló & Eiros Bouza, 2013; Zimmerli et al., 2004).

Los biofilms se definen clásicamente como una comunidad bacteriana (diferentes géneros y especies) que se encuentra irreversiblemente asociada a una superficie, rodeada por una matriz polisacáridica de producción propia. Los microorganismos en el biofilm difieren de sus contrapartes planctónicas en la expresión génica, estado metabólico y fisiológico (Costerton et al., 1999; Wei & Ma, 2013). Una vez maduro el biofilm genera un patrón diferente de crecimiento bacteriano, con una coordinación funcional comunitaria tanto a nivel fisiológico como metabólico que simula la de un tejido eucariótico primario (Dunne Jr, 2002). En el concepto clásico de los biofilms adheridos a superficies su formación presenta 5 etapas que consisten en *i*) unión reversible a la superficie de las bacterias planctónicas, *ii*) unión irreversible a la superficie, *iii*) maduración, donde se da la formación de la matriz extracelular y *iv*) la formación de microcolonias (estructura básica del biofilm), aquí puede existir una estructura tridimensional del tipo hongo o “mushroom-like” y finalmente ocurre el desprendimiento del mismo al medio *v*) dispersión (Bjarnsholt et al., 2013; Costerton & Lappin-Scott, 1995; Dunne Jr, 2002; Vila et al., 2008) (Figura 1).

La dispersión de las células ocurre de dos formas, en la primera las bacterias vuelven al estado planctónico y migran. La otra forma de dispersarse es que una parte del biofilm se desprende y da lugar a la formación de otro biofilm en otro lugar (Tolker-Nielsen, 2015). Recientemente la definición se ha expandido, y se reconoce como biofilms a aquellas comunidades bacterianas que se encuentran adheridas entre sí, pero no necesariamente a una superficie y tienen todas las características de estas estructuras. Se clasifican en biofilms adheridos a superficies y no adheridos (Sauer et al., 2022) (Figura 2).

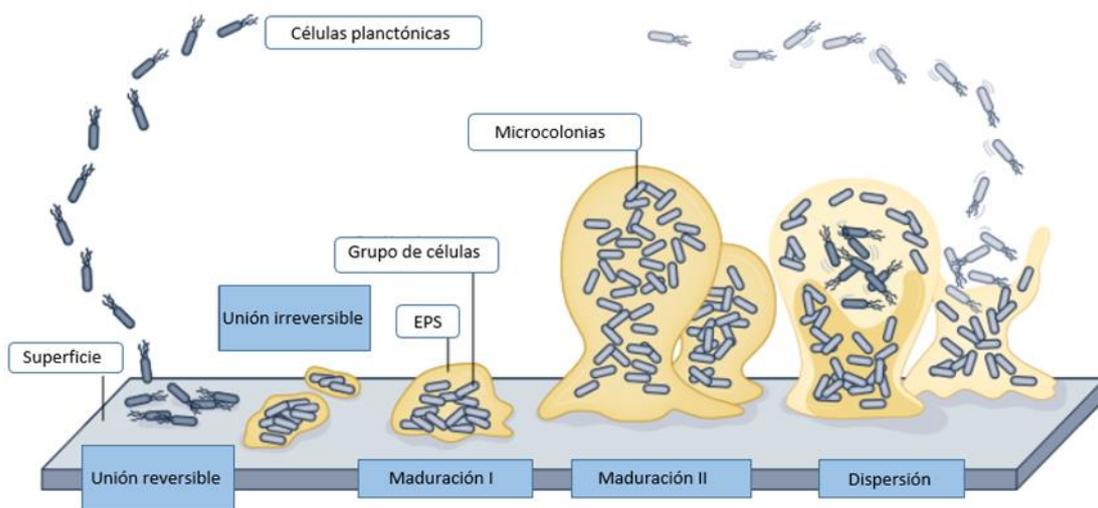


Figura 1. Diagrama de la formación de biofilms clásica. Comienza generalmente con la unión reversible de las bacterias planctónicas a una superficie biótica/abiótica. La siguiente etapa muestra la unión de forma irreversible a dicha superficie. En la maduración I, el grupo de células produce la matriz extracelular (EPS) y en la etapa de maduración II, se da la formación de las microcolonias (estructura básica de los biofilms) y por último se da la dispersión del biofilm, modificado de (Sauer et al., 2022).

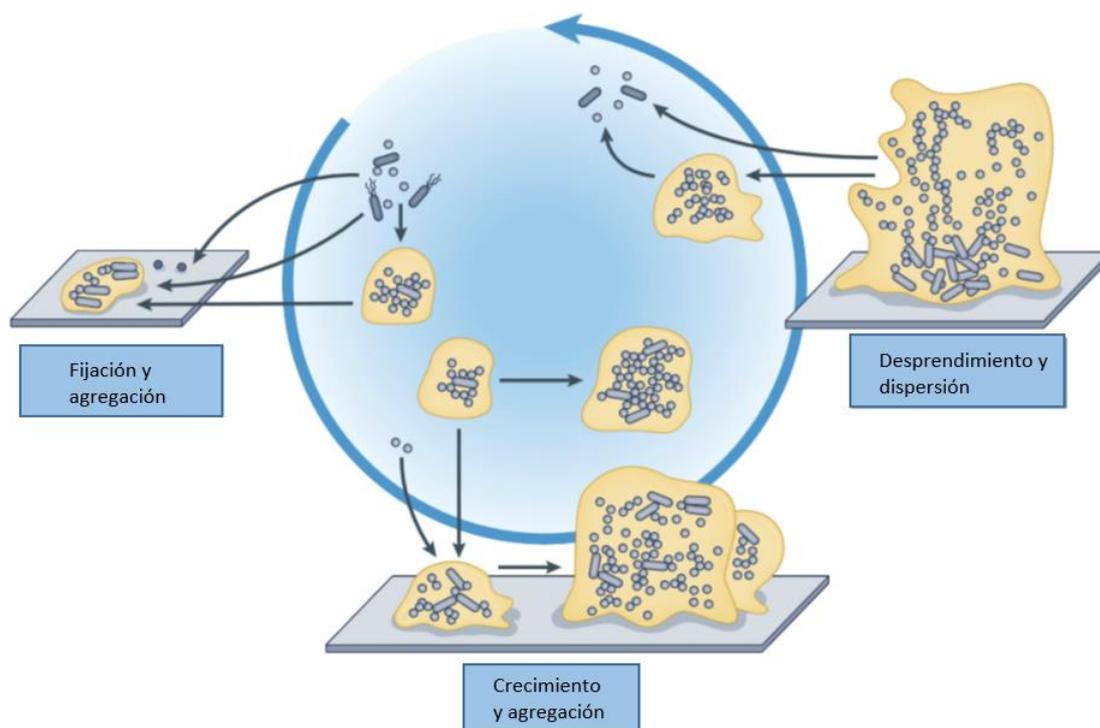


Figura 2. Diagrama de la formación de biofilms, considerando la nueva definición de biofilm en estado libre sin adhesión a una superficie abiótica. Este ciclo puede comenzar con una fase planctónica, donde estas células se adhieren de forma reversible a una superficie biótica/abiótica. A esta etapa le sigue la adhesión irreversible (ciclo convencional de formación de biofilms, parte externa de la figura 2). Pero el ciclo puede comenzar también directamente de biofilms en estado libre (parte interna de la figura 2). En la

maduración se produce la formación de la matriz extracelular (EPS) y la formación de las microcolonias (estructura básica del biofilm). Posteriormente ese biofilm se desprende al igual que algunas células independientes y es allí donde comienza la etapa de dispersión, modificado (Sauer et al., 2022).

Existen varios mecanismos por los que los biofilms presentan resistencia a los antibióticos y esto está vinculado con la tolerancia que poseen las bacterias que lo conforman. La tolerancia de las bacterias de los biofilms a los compuestos antimicrobianos es multifactorial, existen varios mecanismos que trabajan en tándem dentro de los biofilms para reducir la eficacia de los antibióticos generando muchos inconvenientes a la hora de tratar estas infecciones (Anderl et al., 2000; Stewart, 2002). La interacción de mecanismos de tolerancia físicos, fisiológicos y adaptativos permite a las subpoblaciones bacterianas de los biofilms sobrevivir, permitiendo a las células mantener una exposición prolongada a los agentes antimicrobianos sin pérdida de viabilidad (Bjarnsholt et al., 2013). La tolerancia física depende de la matriz y de la estructura tridimensional del biofilm, (que se vincula a la cantidad de material de la matriz física y aumenta con la biomasa) relacionada con la maduración del biofilm. Existen componentes de la matriz extracelular, como el ADN extracelular que poseen la capacidad de quelar antibióticos (Bjarnsholt et al., 2013). Además, la matriz del biofilm limita la difusión, la lenta penetración de los antibióticos en la viscosa matriz favorece la inactivación del antibiótico y dificulta su llegada al sitio blanco de acción en la bacteria (Rajput et al., 2022). Aunque la difusión reducida a través de la matriz del biofilm sólo proporciona un efecto protector a corto plazo frente a los compuestos antimicrobianos (Bjarnsholt et al., 2013).

La tolerancia fisiológica está determinada por los estados metabólicos de las bacterias (Bjarnsholt et al., 2013; Ma et al., 2019; Urish et al., 2016). En los biofilms, se forman gradientes de actividad metabólica, ya que la tasa de crecimiento de la capa interna del biofilm disminuye con el aumento de las limitaciones en el acceso a nutrientes y oxígeno (Gilbert, 1931; Prinzi & Rhode, 2023; Stewart, 2002). Por ejemplo, niveles bajos de oxígeno reducen los efectos bactericidas de antibióticos tales como la tobramicina y ciprofloxacina, mientras que cambios en la concentración del pH pueden afectar de forma negativa la acción de aminoglucósidos (Mukherjee & Bassler, 2019). Se ha demostrado *in vitro* que los biofilms constan de al menos dos subpoblaciones, una población aerobia en crecimiento y una subpoblación anaerobia con crecimiento más lento. Los antibióticos como los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y los β -

lactámicos no funcionan bien en condiciones de hipoxia y, por lo tanto, sólo matan la parte externa en crecimiento del biofilm. (Anderl et al., 2000; Bjarnsholt et al., 2013; Stewart, 2002). La adición de compuestos que estimulan el crecimiento anaeróbico, como la arginina, los nitratos o los nitritos, puede potenciar la eliminación antimicrobiana. Sin embargo, el efecto de eliminación de una mezcla de aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas no es completo, ya que siempre sobrevive una pequeña fracción de bacterias, posiblemente debido al fenómeno de persistencia (Anderl et al., 2000; Stewart, 2002; Stewart & Costerton, 2001). Esto está vinculado a la presencia de bacterias persistentes que ejercen su resistencia dentro del biofilm, las cuales estarían protegidas del sistema inmunitario y así podrían restablecer la infección. La tolerancia fisiológica cesa cuando el biofilm se dispersa (Bjarnsholt et al., 2013; Prinzi & Rhode, 2023; Urish et al., 2016).

En cuanto a la tolerancia adaptativa o transitoria de los biofilms, esta induce de forma transitoria mecanismos de resistencia que hacen que la población bacteriana sea temporalmente refractaria a la acción de los antimicrobianos (Bagge et al., 2000; Elder et al., 1995). La tolerancia adaptativa es adquirida por subpoblaciones de microorganismos en los biofilms y depende de la presencia del agente antimicrobiano. No requiere cambios genéticos, pero está mediada por redes reguladoras y se desactiva o invierte cuando se interrumpe la exposición a los antibióticos (Bjarnsholt et al., 2013). Esta tolerancia adaptativa puede ser inespecífica o específica para un determinado tipo o clase de antibióticos. La inducción de la transcripción de β -lactamasas en respuesta a la presencia de un antibiótico β -lactámico es un ejemplo de mecanismo de tolerancia específico a un antibiótico (por efecto de protección de la población que no las expresa). La secreción de β -lactamasas en los biofilms puede impedir la penetración de las moléculas β -lactámicas a través de las capas del biofilm (Bjarnsholt et al., 2013). Un ejemplo de mecanismo adaptativo inespecífico es la regulación al alza de las bombas de eflujo. Esta regulación puede desencadenarse por la presencia de antibióticos o como parte de las respuestas bacterianas al estrés. Por ejemplo, al estrés oxidativo, las bombas de eflujo representan un mecanismo para la eliminación de compuestos tóxicos que se acumulan en los biofilms (Alav et al., 2018; Bjarnsholt et al., 2013; Hassanzadeh et al., 2020). Esto se ha demostrado para varias especies de bacterias en biofilms y afecta a su tolerancia a varias clases de antibióticos, como el macrólido azitromicina y el péptido

antimicrobiano colistina, así como biocidas como EDTA, SDS y clorhexidina (Bjarnsholt et al., 2013).

Una de las mayores ventajas de las bacterias dentro del biofilm es la proximidad de múltiples bacterias entre sí. Esto permite estrategias de comunicación bacteriana como "quorum sensing", y también favorece la transferencia de elementos genéticos móviles (Jiang et al., 2019; Miller & Bassler, 2001). De hecho, el entorno próximo dentro del biofilm favorece la estabilidad de los plásmidos y permite a los organismos la transferencia horizontal de genes de resistencia que, debido a la proximidad de las bacterias, es más eficaz en los biofilms que en las bacterias planctónicas. Es probable que este mecanismo desempeñe un papel en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos si el plásmido que determina la resistencia, está presente en la fase inicial de la formación del biofilm. En los biofilms maduros, la transferencia horizontal de genes a través de la dispersión de plásmidos puede verse afectada por limitaciones espaciales y nutricionales (Hausner & Wuertz, 1999; Madsen et al., 2012).

A su vez muchos de los fragmentos de ADN transponibles transferidos por las bacterias codifican factores promotores de la formación de biofilm, lo que contribuye aún más a la sostenibilidad del biofilm y de la infección en el paciente (Prinzi & Rhode, 2023). Los genes diana para la regulación de la detección del quórum sensing, suelen codificar factores de virulencia y proteínas implicadas en el desarrollo de la tolerancia a los antibióticos y la protección frente a las células inmunitarias (Bjarnsholt et al., 2013). Cabe destacar que *in vitro*, los biofilms recién formados son mucho más susceptibles a los antibióticos y más aún existe una diferencia marcada entre el primer día de su formación que entre 3 y 5 días después (Bjarnsholt et al., 2013).

Las células que crecen en los biofilms inician una respuesta de estrés tras la exposición a antibióticos, con un aumento de la expresión del factor sigma de fase estacionaria (RpoS) e hipermutabilidad lo que es indicativo de mutagénesis inducida por estrés (Bjedov et al., 2003; Xu et al., 2001). Se ha sugerido que el estrés oxidativo endógeno es una de las causas del aumento de la mutabilidad en los biofilms. En el lugar de la infección, las células inflamatorias que rodean al biofilm pueden liberar especies de oxígeno reactivas mutagénicas adicionales, o los antibióticos pueden inducir las intracelularmente para favorecer el aumento de la mutabilidad y la aparición de resistencia a los antibióticos (Alav et al., 2018; Boles & Singh, 2008; Driffield et al., 2008; Hassanzadeh et al., 2020) ver figura 3.

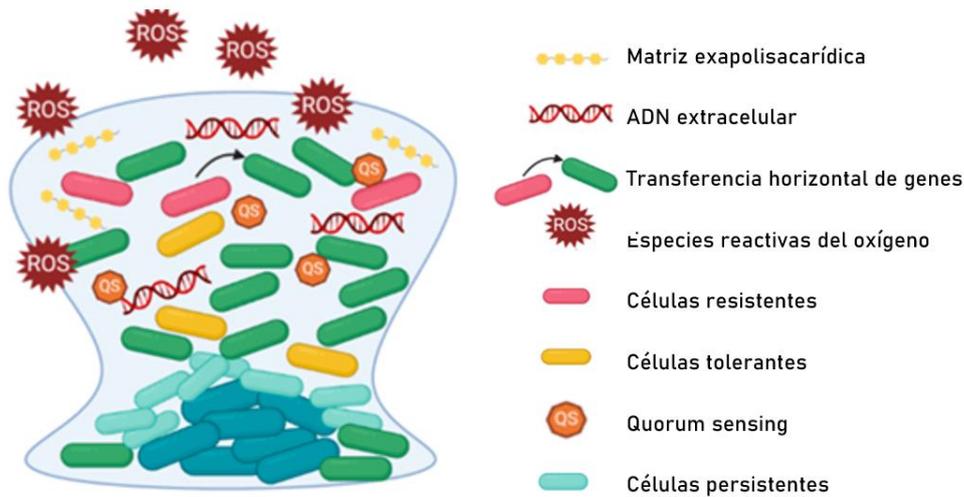


Figura 3. Mecanismos de resistencia que ocurren en un biofilm maduro adaptado de (Prinzi & Rhode, 2023).

1.3 Métodos de estudio microbiológicos para el aislamiento de microorganismos en prótesis de cadera

El diagnóstico microbiológico es crítico para identificar el agente etiológico, para ello es muy importante disponer de uno o varios métodos efectivos de recuperación bacteriana (Drago et al., 2019). Muchas técnicas se han ido incorporando para intentar mejorar la recuperación bacteriana de los implantes liberándolos de los biofilms. El ditiotreitól o DTT se ha propuesto para la remoción de los microorganismos en biofilms sobre prótesis articulares previo al diagnóstico microbiológico. Sus principales ventajas son la facilidad de uso y la reducción de la contaminación ya que no requiere manipulación abierta y extensa de la muestra. Además de ser un método económico que no necesita de equipamiento específico para el diagnóstico (De Vecchi et al., 2016). El ditiotreitól es un compuesto de sulfhidrilo que actúa como fuerte reductor y desnaturizante de proteínas. Previene la formación de puentes disulfuro intra e intermolecular entre residuos de cisteína. Se ha demostrado que compuestos sulfhidrilos, como lo es el DTT, son capaces de reducir la formación de biofilm *in vitro* de *S. aureus*, mediante la inhibición en la biosíntesis de polisacáridos, evitando la adhesión

intercelular (De Vecchi et al., 2016). Estas características favorecen el desprendimiento de bacterias de los biofilms en implantes de prótesis, lo cual lo califica como método utilizable para desprendimiento de las bacterias y posterior diagnóstico microbiológico (De Vecchi et al., 2016).

Otro método que ha mostrado buenos resultados para la recuperación de microorganismos a partir de prótesis es la sonicación (método mecánico) (De Vecchi et al., 2016; Portillo et al., 2014; Shen et al., 2015; Trampuz et al., 2007). En este caso el uso de equipamiento específico de laboratorio es necesario y el trabajo en condiciones de esterilidad, son cruciales para evitar posibles riesgos de contaminación (mal sellado o rotura de la bolsa que contiene el dispositivo médico, entre otros).

Mediante vibraciones ultrasónicas el biofilm es alterado, lo que permite el desprendimiento de las bacterias adheridas a la prótesis sin producir su lisis (Zimmerli & Sendi, 2017). Incluso trabajos como el de Trampuz et al., (2007) mencionan una mayor sensibilidad con la utilización de este método para el diagnóstico microbiológico. Sin embargo la duración de la exposición a las vibraciones ultrasónicas es una variable importante a considerar, ya que la vibración excesiva puede romper las paredes celulares de la bacteria y disminuir la posibilidad de recuperar a los microorganismos involucrados al producir su lisis (Keeshen et al., 2017). La sonicación desprende los biofilms de los implantes removidos, permite aislar los microorganismos mejorando en un 30% la detección e identificación de los agentes etiológicos en comparación al uso del DTT (Drago et al., 2013; Portillo et al., 2014; Zhai et al., 2014). El sonicado es un método que incluso es efectivo para la remoción bacteriana del implante en pacientes con tratamiento antibiótico previo a la artroplastia de remoción (Shen et al., 2015). Sin embargo, son pocos los estudios que reportan la efectividad de las metodologías utilizadas para la recuperación bacteriana de prótesis en general (Trampuz et al., 2007). Por lo tanto, es relevante evaluar el uso del sonicado como método de recuperación bacteriana en estos dispositivos y específicamente en prótesis de cadera.

1.4 Agentes etiológicos

Los agentes etiológicos más frecuentes relacionados con las infecciones de prótesis de cadera en varias regiones del mundo son *S. aureus*, y *S. epidermidis* (Alonzo

III & Torres, 2014; McCarthy & Lindsay, 2010; Ramirez-Sanchez et al., 2021; Saginur et al., 2006; Tande et al., 2014; Zeller et al., 2018). A su vez *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*) integrante de la microbiota cutánea humana es responsable del 10-20% de las infecciones clínicas vinculadas a dispositivos médicos (Crabbé et al., 2019; Heilmann et al., 2019; Lamret et al., 2020). Está muy extendido en los hospitales y entre el personal sanitario, siendo un microorganismo emergente causante de infecciones nosocomiales (Heilmann et al., 2019; Olsen, 2015).

Estudios comparativos entre dos clínicas, una en Estados Unidos y la otra en Europa central, reportan que más del 50% de las infecciones de prótesis de cadera son causadas por bacterias del género *Staphylococcus* (Aggarwal et al., 2014). También se han reportado otras cepas de *Staphylococcus* como es el caso de *S. lugdunensis* y *S. capitis*, así como *Streptococcus* y en menor proporción bacilos Gram negativos y algunos microorganismos anaerobios (Tande et al., 2014).

1.4.1 Principales características de *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus es un género que se caracteriza por ser cocos Gram positivos agrupados en acúmulos en forma de racimos de uva. Su identificación mediante pruebas bioquímicas evidencia que son catalasa positivos. Mediante la prueba de coagulasa podemos diferenciar a *S. aureus* coagulasa positivo, de otros *Staphylococcus* coagulasa negativos como *S. epidermidis* o *S. haemolyticus* (Planet et al., 2017). *S. aureus* es una especie bacteriana con un genoma central conservado, su evolución se debe principalmente a la mutación y la transferencia horizontal de genes. Los elementos genéticos móviles (fagos), son uno de los factores que más contribuyen a la variación entre cepas de *S. aureus*. Debido a su bajo nivel de competencia natural, la transducción de bacteriófagos es un modo frecuente de transferencia de ADN entre cepas de *S. aureus* para poder captar ADN exógeno (Jenul & Horswill, 2018). Las bacterias con mutaciones que las hacen resistentes a los antibióticos pueden formar biofilms tras la adquisición de estas mutaciones, pero el modo de crecimiento en los biofilms también favorece la aparición de mutaciones. Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición a antibióticos induce la selección de mutantes resistentes y que la tasa de mutación en los biofilms es

mayor que en las bacterias planctónicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ciofu et al., 2017; Driffield et al., 2008).

1.4.2 Principales factores de virulencia de *Staphylococcus* spp.

Existe una amplia gama de factores de virulencia asociados al género *Staphylococcus*. La maquinaria reguladora y los factores de virulencia se conocen como genes accesorios, debido a que no son esenciales para el crecimiento normal de la bacteria (Jenul & Horswill, 2018). Estos se utilizan para establecer la dominancia en el hospedador y contribuyen a la patogenicidad, la evasión de las defensas del hospedero y la degradación y la adquisición de nutrientes (Edwards et al., 2010). En *S. aureus* se incluyen componentes de la superficie celular y proteínas liberadas directamente al medio extracelular (Jenul & Horswill, 2018). Existen también factores de virulencia vinculados a la cápsula bacteriana (Cárdenas-Perea et al., 2014).

Dentro del grupo de factores de virulencia vinculados a las proteínas de superficie encontramos un conjunto de proteínas encargadas de los pasos iniciales en la adhesión a la matriz y posterior colonización (McCarthy & Lindsay, 2010; Paharik & Horswill, 2016). Estas adhesinas se conocen por su sigla en inglés MSCRAMMs (microbial surface components that recognize adhesive matrix molecules) (Foster et al., 2014). También se reconocen las SERAMs (su sigla en inglés secretable expanded repertoire adhesive molecules) las cuales son secretadas fuera del soma bacteriano (Hauck & Ohlsen, 2006; Peacock et al., 1999). Además, se han identificado 21 genes que codifican proteínas de superficie pertenecientes a la familia LPXTG (su sigla en inglés LeuPro-X-Thr-Gly; donde X puede ser cualquier aminoácido). Se sabe que *S. aureus* expresa 11 proteínas LPXTG, entre ellas los factores de unión a la fibronectina A y B (FnbPA y FnbPB) que son de gran importancia en la colonización de la bacteria al endotelio (Herrmann et al., 1988; O'Neill et al., 2008). Estas, le proveen a los biofilms la capacidad de perpetuar la infección (cronificarse y causar procesos recurrentes) además le permite generar focos a distancia (metastásicos) o complicaciones invasivas como la sepsis (Cervantes-García et al., 2014). Aquí también se encuentran las proteínas encargadas de aglutinarse por medio de factores anclados a la pared celular como es el caso de “Clumping factor” (ClfA) y proteína de unión al colágeno (cna) (Hauck & Ohlsen, 2006; Peacock et al.,

1999; Roche et al., 2003). Éstas se unen al extremo C-terminal de la fibronectina formando un “entramado” en la superficie bacteriana (Patti et al., 1992; Smeltzer et al., 1997). Estas proteínas a menudo coexisten con otros componentes de la superficie como es el caso de la adhesina intercelular polisacáridica (PIA) codificados por el operón *ica*ABCD (Geoghegan et al., 2010; Heilbronner et al., 2011; Nilsson et al., 1998). También participa en el paso de adhesión intercelular de la formación de biofilm al codificar proteínas implicadas en la síntesis del polisacárido de la matriz del biofilm poli-N-succinil b-1-6 glucosamina (PIA-PNSG), que es uno de los principales promotores de adhesión y acumulación de bacterias (Nguyen et al., 2020). La síntesis de la proteína asociada a biofilm (*bap*) también participa de la adhesión, formación y estabilización de los biofilms y lo hace de forma independiente a la presencia de PIA anteriormente mencionado (Arciola et al., 2005; Cucarella et al., 2001; O’Gara, 2007; Suresh et al., 2019; Valle Turrillas et al., 2012).

Las exoenzimas son secretadas y algunas de ellas como hialuronidasa y ADNasas generan nutrientes a partir de componentes del hospedero útiles para el crecimiento bacteriano. Existen dos grupos de proteínas formadoras de poros, según la estructura de sus componentes transmembrana: α cuyos poros consisten en α -hélices, y β que forman poros de membrana tipo β (Alonzo III & Torres, 2014). Particularmente *S. aureus* posee siete tipos de proteínas formadoras de poro tipo β : α -hemolisina (α -toxina, Hla) y seis tipos de leucocidinas, un ejemplo de estas últimas es Leucocidina de Panton Valentine (PVL) (Ouchenane et al., 2011; Seilie & Wardenburg, 2017; Yoong & Torres, 2015).

S. aureus también puede producir exotoxinas implicadas en el síndrome del “shock tóxico estafilocócico” (tsst, por su sigla en inglés *toxic shock syndrome toxin*). Estas toxinas son capaces de unirse directamente al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de las células presentadoras de antígenos, estimulando el sistema inmune con una respuesta policlonal (Bukowski et al., 2010; Javouhey et al., 2018; Ladhani, 2003; Low, 2013). Otro tipo de exoenzimas son las super-óxido-dismutasas (sods) que desempeñan un papel fundamental en la defensa contra la oxidación. Éstas convierten el superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, mientras que la catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. De esta forma, este factor de virulencia contrarresta la acción de los radicales libres una vez que son fagocitadas por el hospedero (Valderas et al., 2002).

La cápsula bacteriana está formada por una red de polímeros que cubre la superficie de una bacteria. En su mayoría, están compuestas de polisacáridos que se distribuyen de forma homogénea alrededor del cuerpo bacteriano, formando una malla. El principal papel de la cápsula bacteriana es proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero (activación del complemento y muerte mediada por fagocitosis) (Cárdenas-Perea et al., 2014). En aislamientos de *S. aureus* procedentes de infecciones de piel y tejidos blandos es frecuente encontrar los serotipos capsulares de tipo 8 (*cap8*) y el de tipo 5 (*cap5*) (Geoghegan et al., 2010; Jenul & Horswill, 2018; Paharik & Horswill, 2016; Watts et al., 2005). Este último ha sido asociado a infecciones severas, aunque el rol de la cápsula es discutido. En Uruguay, se han descrito cepas causantes de infecciones de piel y tejidos blandos en pacientes ambulatorios adultos y pediátricos durante 2004-2005, resistentes a meticilina y portadores del gen *cap8* (Pardo et al., 2009).

1.4.3 Resistencia antibiótica en *Staphylococcus* spp.

1.4.3.1 Resistencia a β -lactámicos

Una característica biológica importante de *Staphylococcus* spp. es su capacidad de adquirir material genético exógeno que codifica varios mecanismos de resistencia a varios antibióticos (Pardo et al., 2020). Presenta diversos mecanismos de resistencia a los β -lactámicos como producción de penicilinasas y cambios en el sitio blanco de acción. El 90% de las cepas de *S. aureus* producen penicilinasas que confieren resistencia a penicilina G, ampicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas (Yamaguchi et al., 2020).

El cassette cromosómico móvil estafilocócico *mec* (SCC*mec*) lleva el gen *mecA* que codifica una proteína fijadora de penicilina (penicillin binding protein PBP) nueva, llamada PBP2a o PBP2' con una afinidad muy disminuida a los β -lactámicos, pero mantiene su actividad de transpeptidasa en la síntesis de la pared bacteriana (Baig et al., 2018; Deurenberg & Stobberingh, 2008). Esto causa resistencia a la meticilina y a todos los demás antibióticos β -lactámicos, excepto a las cefalosporinas de 5ta generación

(Edwards et al., 2012; Foster et al., 2014). A diferencia de las cepas meticilino sensibles (SAMS), las cepas meticilino resistentes (SAMR) presentan el gen *mecA*. En la actualidad existen 3 categorías de SAMR, en función de criterios epidemiológicos y el lugar de adquisición de la infección. Allí encontramos a (SARM-AC), asociadas a la comunidad, (HA-MRSA) asociadas a la atención sanitaria y (SARM-AL) asociadas al ganado (Pardo et al., 2020). Se han descrito 13 cassettes de resistencia, I, II y III entre otros SCC*mec* están vinculados a los aislamientos hospitalarios o también llamados meti-multirresistentes, y los cassettes IV, V y VI están vinculado a cepas comunitarias o no multirresistentes (Baig et al., 2018; Foster, 2017; Yamaguchi et al., 2020).

Los SAMR fueron catalogados como una "amenaza grave" según un informe del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), donde se registraron 323.700 casos de pacientes con infecciones invasivas por SAMR relacionados con alrededor de 10.600 muertes que se produjeron entre 2012 y 2017 (Center of Disease Control and Prevention - CDC, 2019). La propagación de clones epidémicos de SAMR a nivel mundial es preocupante, ya que limita las opciones de antibióticos para tratar las infecciones por SAMR (Boswihi & Udo, 2018). La vancomicina es el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones por SAMR multirresistente. Sin embargo, ha aparecido *S. aureus* con susceptibilidad reducida a la vancomicina (SARV) (Boswihi & Udo, 2018).

1.4.3.2 Resistencia a glicopéptidos

Los glicopéptidos, como la vancomicina, actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana mediante una unión de gran afinidad con el extremo D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. La resistencia a glicopéptidos se ha descrito tanto en aislamientos clínicos de estafilococos coagulasa negativos como en *S. aureus*. Se describen cepas con sensibilidad disminuida, y también resistentes a estos antibióticos. La resistencia intermedia a la vancomicina se denomina VISA y está mediada por una alteración en la regulación del metabolismo en la síntesis de la pared bacteriana. Esto supondría un aumento en la producción de D-ala D-ala, generando una pared más gruesa o precursores D-ala D-ala libres que impiden que el antibiótico pueda penetrar la pared y evitar su llegada al sitio de acción (Foster, 2017; Zeng et al., 2016).

Las bacterias en los biofilms adoptan un fenotipo que les confiere resistencia intrínseca a muchos antibióticos. Por ejemplo, la tasa de crecimiento reducida de las bacterias asociadas a biofilms limita la eficacia de los antibióticos dirigidos a la biosíntesis de la pared celular, algo que puede verse reflejado en tratamiento con vancomicina (Beenken et al., 2004). En el caso de las bacterias formando biofilms, la unión de la vancomicina a las células de las capas más profundas requiere más tiempo de exposición al antibiótico debido a una disminución en la velocidad de penetración en el biofilm (Jefferson et al., 2005; Reynolds & Somner, 1990).

1.4.3.3 Resistencia a lincosamida

Las lincosamidas, como la clindamicina, actúan inhibiendo la subunidad 50s ribosomal alterando la síntesis proteica. La resistencia a éstos antibióticos en *Staphylococcus* puede ocurrir por modificación del ribosoma, molécula blanco de este grupo de antibióticos (Brickner et al., 2008). La forma en que alteran el ribosoma es mediante enzimas que metilan un residuo específico en el rRNA. Los genes que codifican esta resistencia se encuentran tanto en plásmidos como en el cromosoma. La expresión de estos genes puede ser constitutiva o inducible (Long & Vester, 2012; Wilson, 2014). Se observa que eritromicina resulta buen inductor de la expresión de esta resistencia mientras que no lo es la clindamicina. Por lo tanto, si la cepa en estudio posee este mecanismo de resistencia de forma inducible, debemos colocar los discos de eritromicina y clindamicina entre 15 y 20 mm, para que se forme una “D” en el test por difusión en agar. Otro mecanismo de resistencia a estos antibióticos se da por la producción de una bomba de eflujo ATP-dependiente, que solo afecta a macrólidos (CLSI, 2021).

Muchos antibióticos no penetran fácilmente en los biofilms, lo que da lugar a la presencia de concentraciones subinhibitorias de antibióticos (Herbert et al., 2001). Schilcher et al (2016) mostraron que las concentraciones subinhibitorias de clindamicina desencadenaron una respuesta de estrés transcripcional en *S. aureus* a través del factor B sigma alternativo. Esto aumentó la expresión de los principales genes asociados a biofilms entre los que se encuentran *fnbA* y *fnbB*. Las concentraciones subinhibitorias de clindamicina alterarían la capacidad de *S. aureus* para formar biofilms y cambiarían la composición de la matriz, aumentando el contenido de ADN extracelular (ADNe)

(Kaplan, 2011; Schilcher et al., 2016). El ADN cargado negativamente desempeña un papel importante durante la adhesión y la maduración del biofilm. Proteínas de la matriz se asocian con la superficie celular tras la caída del pH que se produce de forma natural durante la formación del biofilm (Dengler et al., 2015).

La clindamicina, es un inhibidor de la síntesis proteica y es utilizada comúnmente en el tratamiento de infecciones bacterianas por Gram positivas, ya que modula la producción de varias toxinas y factores de virulencia en *S. aureus* (Dumitrescu et al., 2008; Ohlsen et al., 1998). La clindamicina alcanza niveles intracelulares elevados en huesos y células fagocíticas, potencia la opsonización y la fagocitosis a concentraciones subinhibitorias (Mader et al., 1989; Veringa & Verhoef, 1986). A su vez concentraciones subinhibitorias de clindamicina desencadenan una respuesta transcripcional que altera la matriz extracelular fomentando la formación de biofilms (Schilcher et al., 2016).

1.4.3.4 Resistencia a quinolonas

La ciprofloxacina, al igual que otras quinolonas, inhibe la ADN girasa (Sanders, 1988). La resistencia a la ciprofloxacina parece producirse tanto por mutación en su diana (la subunidad A de la ADN girasa como por mutaciones en los genes que codifican para topoisomerasas fundamentalmente la IV) como por alteración en la permeabilidad del fármaco a través de la membrana externa de la célula o por producción de bombas de eflujo (Hooper et al., 1987). Las cepas pueden resultar sensibles al inicio de la terapia con estos antimicrobianos y desarrollar resistencia en el transcurso de la misma (Foster, 2017; Hooper & Jacoby, 2015).

1.4.3.5 Resistencia a Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos, como la gentamicina, actúa a nivel ribosomal y poseen un efecto bactericida (Foster, 2017). El mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más comúnmente encontrado en *S. aureus*, es la alteración del sitio blanco de acción mediante modificaciones en el ribosoma (Foster, 2017; Walsh & Wencewicz, 2016).

La gentamicina suele ser un antibiótico de tercera línea en el tratamiento de infecciones clínicas por *S. aureus*. Se ha observado que los aminoglucósidos inducen la formación de biofilms en ciertas bacterias Gram negativas (Hoffman et al., 2005). El metabolismo oxidativo reducido que se aprecia en los biofilms limita la absorción de aminoglucósidos, incluidos la gentamicina (Beenken et al., 2004). Cada vez hay más pruebas de que, en determinadas condiciones, los aminoglucósidos pueden favorecer el desarrollo de biofilms (Hess et al., 2011). Hess et al (2011) utilizó un modelo *in vitro* para probar la hipótesis de que la presencia de gentamicina favorecía la formación de los biofilms. De su trabajo se destaca que a concentraciones subinhibitorias y/o inhibitorias de gentamicina aumentan la biomasa del biofilm. Esto se debe a una alteración en la actividad metabólica y a una modificación de la ultraestructura de los biofilms de *S. aureus*.

1.5 Medidas de prevención y tratamientos sugeridos para infecciones en prótesis de cadera

El primer paso para combatir una posible infección por biofilms es la prevención, eliminando las bacterias mientras aún son planctónicas y mucho más susceptibles a los antibióticos. Si se impide la agregación inicial, se espera que las defensas del hospedero fagociten con éxito las bacterias y que los antibióticos tengan una eficacia óptima. Sin embargo, como la formación inicial del biofilm en el lugar de la infección genera muy poca inflamación, es muy difícil, si no imposible detectar las bacterias precursoras de dicha infección (Bjarnsholt et al., 2013).

Para reducir el riesgo de infecciones los centros de salud han incorporado varias estrategias profilácticas, en el preoperatorio, se ha reportado el uso de antisépticos a base de yodo y gluconato de clorhexidina (Kapadia et al., 2016). El cemento óseo usado para fijar las prótesis se utiliza cargado con antibióticos que se liberan localmente (Ensing et al., 2006). Incluso muchos dispositivos ortopédicos, como los implantes de cadera y rodilla, también se han recubierto con antibióticos, la desventaja de esta estrategia es que la liberación de antibióticos de un implante terminará con el tiempo. Además, la capa glucoproteínica derivada del hospedero puede dificultar la liberación de antibióticos y

reducir la eficacia de las superficies antiadherentes (Vasilev et al., 2009). También se sugiere, para la realización de estos procedimientos, la utilización de “salas blancas” (flujo laminar quirúrgico) que disminuye el riesgo de infección (Trampuz & Zimmerli, 2005).

Una vez que se detecta el proceso inflamatorio, el biofilm ya se ha formado. Para intentar erradicarlo, hay que diseñar un complejo tratamiento que sea capaz de abordar contextos clínicos diferentes, que se base en estrategias quirúrgicas y médicas específicas, las cuales deben adaptarse al paciente (Le Vavasseur & Zeller, 2022; Zeller et al., 2018). Las infecciones de prótesis articular requieren una óptima cobertura antibiótica, especialmente durante la fase temprana (primeras semanas postoperatorias). Su eficacia depende en gran medida de la elección y la calidad del procedimiento quirúrgico, así como de la calidad del diagnóstico microbiológico (Le Vavasseur & Zeller, 2022).

En el acto quirúrgico la utilización de antibióticos sistémicos intraoperatorios es el procedimiento estándar (Kapadia et al., 2016). En cuanto a los antibióticos utilizados para erradicar las infecciones, algunos estudios han reportado que la vancomicina se utiliza en pacientes colonizados por *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) (Kapadia et al., 2016). Otros han reportado que la clindamicina es efectiva para el tratamiento de Gram positivos y anaerobios que se utilizan a menudo en pacientes con alergia a los β -lactámicos (Bulloch et al., 2016). El uso de éstos últimos junto con glicopéptidos como la vancomicina pueden ser útiles al inicio de la infección, previo a utilizar fluoroquinolonas o rifampicina (Høiby et al., 2010; Zimmerli & Sendi, 2017).

El tratamiento de las infecciones asociadas a los biofilm es muy difícil, sobre todo cuando no se remueve el implante infectado. El biofilm disminuye la eficacia de los antibióticos. Por lo que una estrategia más eficaz consiste en retirar el dispositivo, ya que la erradicación del biofilm mediante antibioterapia por sí sola ha demostrado ser difícil (Le Vavasseur & Zeller, 2022). Es fundamental la optimización y adecuación de los antibióticos según las características de cada paciente, patología de base, tolerancia a los fármacos y a la susceptibilidad de los microorganismos (Le Vavasseur & Zeller, 2022). La determinación de las concentraciones plasmáticas del fármaco, la evaluación tanto de la farmacocinética como de la farmacodinamia, junto con la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM por su sigla en inglés) y la infusión prolongada o continua a dosis altas con antibióticos dependientes del tiempo, es una de las formas

de optimizar el uso de antibióticos (Le Vavasseur & Zeller, 2022).

1.6 Problema de investigación

Debido a la escasa información existente en Uruguay vinculada a las infecciones de artroplastias de cadera, a través de una colaboración entre el Banco de Prótesis de Uruguay, el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, se genera la posibilidad de trabajar en conjunto con el fin de generar datos que pudieran aportar información nacional relacionada a esta problemática. Estudiamos el biofilm y su vinculación con las infecciones de prótesis de cadera como posible explicación a los fallos terapéuticos empleados, que muchas veces conducen a la remoción de la prótesis. Este proyecto de maestría busca colaborar con el aporte de información relevante vinculada a las infecciones de prótesis de cadera en el país.

2. Hipótesis de trabajo

La resistencia a los tratamientos antibióticos está dada por la formación de biofilms sobre los implantes ortopédicos. La presencia de genes de virulencia en estos microorganismos, podría potenciar aún más la formación de dichos biofilms.

2.1 Predicciones

Para verificar la hipótesis de este trabajo deben de cumplirse las siguientes predicciones:

1. Las prótesis de cadera removidas presentan biofilms asociados en su superficie.
2. Los microorganismos recuperados son capaces de generar biofilms *in vitro*.
3. Los tratamientos con antibióticos de uso habitual en infecciones de prótesis articular de cadera no inhiben el desarrollo de los biofilms, mientras que las células planctónicas

presentan sensibilidad a dichos tratamientos.

4. Los patógenos recuperados presentan genes de virulencia asociados a la formación de biofilms.

3. Objetivo general

Evaluar la presencia de biofilms en las prótesis de cadera extraídas de pacientes por sospecha de infección, en el período comprendido 2019-2021.

Analizar las principales características que vinculan a *Staphylococcus* spp., en las infecciones de prótesis de cadera

3.1 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de biofilms *in situ* en las prótesis de cadera.
2. Implementar método para el desprendimiento del biofilm.
3. Identificar los agentes etiológicos vinculados a estas infecciones.
4. Evaluar condiciones óptimas para la formación de biofilms *in vitro*.
5. Clasificar los agentes etiológicos según su capacidad formadora de biofilms *in vitro*.
6. Determinar la susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus* spp.
7. Evaluar la efectividad de distintos antimicrobianos en inhibir la formación biofilm de *Staphylococcus* spp.
8. Determinar la presencia de genes de virulencia en *Staphylococcus* spp.

4. Metodología

4.1 Población de estudio

Se incluyeron pacientes con sospecha de infección de prótesis de cadera que requirieron remoción quirúrgica del dispositivo médico, asistidos en el Banco de Prótesis de Uruguay, en el período comprendido entre setiembre de 2019 y setiembre de 2021.

4.2 Aspectos éticos

Los distintos aspectos éticos de la tesis fueron considerados tanto por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, como por el comité de ética de la Facultad de Medicina. A los pacientes que fueron incluidos en este estudio se les solicitó consentimiento informado por escrito. La información relativa a los datos personales de los pacientes, se manejó de forma confidencial y se utilizó código interno para mantener la trazabilidad de las muestras.

4.3 Aspectos técnicos

Las muestras extraídas quirúrgicamente (Figura 4) refrigeradas y en condiciones de esterilidad fueron transportadas al Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).



Figura 4. Prótesis de cadera removida quirúrgicamente en Banco de Prótesis de Uruguay.

4.3.1 Recuperación bacteriana

La sonicación se utilizó como método mecánico para el desprendimiento del biofilm y lograr así la recuperación bacteriana (Drago et al., 2019). Inicialmente las prótesis de cadera se depositaron dentro de bolsa estéril con *buffer* (solución de lavado estéril: PBS, EDTA 0.4% y KCl 2%), el volumen del *buffer* varió entre 50 y 100 ml dependiendo del tamaño de la prótesis, que luego se cerró de forma hermética. Dicha bolsa a su vez fue depositada dentro de otra bolsa estéril conteniendo 100 ml de agua estéril, por lo tanto, la prótesis a analizar fue sellada con doble bolsa estéril. Esto se realizó dentro de una cámara de flujo laminar BSL-2. Dicha bolsa doble sellado (conteniendo la prótesis) fue depositada en un recipiente con hielo y sonicada. Para ello se utilizó sonicador (Ultrasonic Homogenizar 4710 Series) sometiendo las muestras a pulsos de 20 KHZ durante 5 minutos (modificado de Holinka et al., 2011; Keeshen et al., 2017). Posteriormente, se tomaron 100 μ L de la solución de sonicado y se sembró en medios Tripticasa Soja agar (TSA) y también se tomaron 100 μ L de la solución de sonicado y se sembró en medio agar sangre (AS). A su vez, se transfirió 1 mL de la solución sonicada y se transfirió a 9 mL de caldo Luria Bertani (LB) (dilución 1/10) para lo cual se utilizó un falcon de 50 ml cerrado herméticamente. Esto se realizó en condiciones de esterilidad

utilizando nuevamente la cámara de flujo BSL-2 y fue incubado a 37°C por 24 horas. La prótesis de cadera dentro de la bolsa conteniendo el buffer también fue incubada a 37°C. Luego de 24 horas de incubación, se tomaron 100 µL de solución (dilución 1/10 en falcon) y se sembraron en los medios TSA y AS, que se incubaron a 37°C por 24 horas.

Para evaluar si hubo crecimiento bacteriano, se analizó la turbidez y producción de gas en cada bolsa sellada herméticamente con la prótesis articular. Se observó también turbidez en el tubo falcon de 50 ml. También se observó la presencia de colonias sobre las placas de agar sembradas. El control de crecimiento bacteriano se realizó cada 24 horas, y el proceso se extendió durante 14 días, o hasta la detección de alguna colonia bacteriana en las placas de agar sembradas. Cuando se obtuvo crecimiento bacteriano, se realizó tinción de Gram y posterior identificación por MALDI-TOF. Posteriormente esa cepa pura fue almacenada a -80°C, tanto en IIBCE como en el Instituto de Higiene (ver Figura 5).

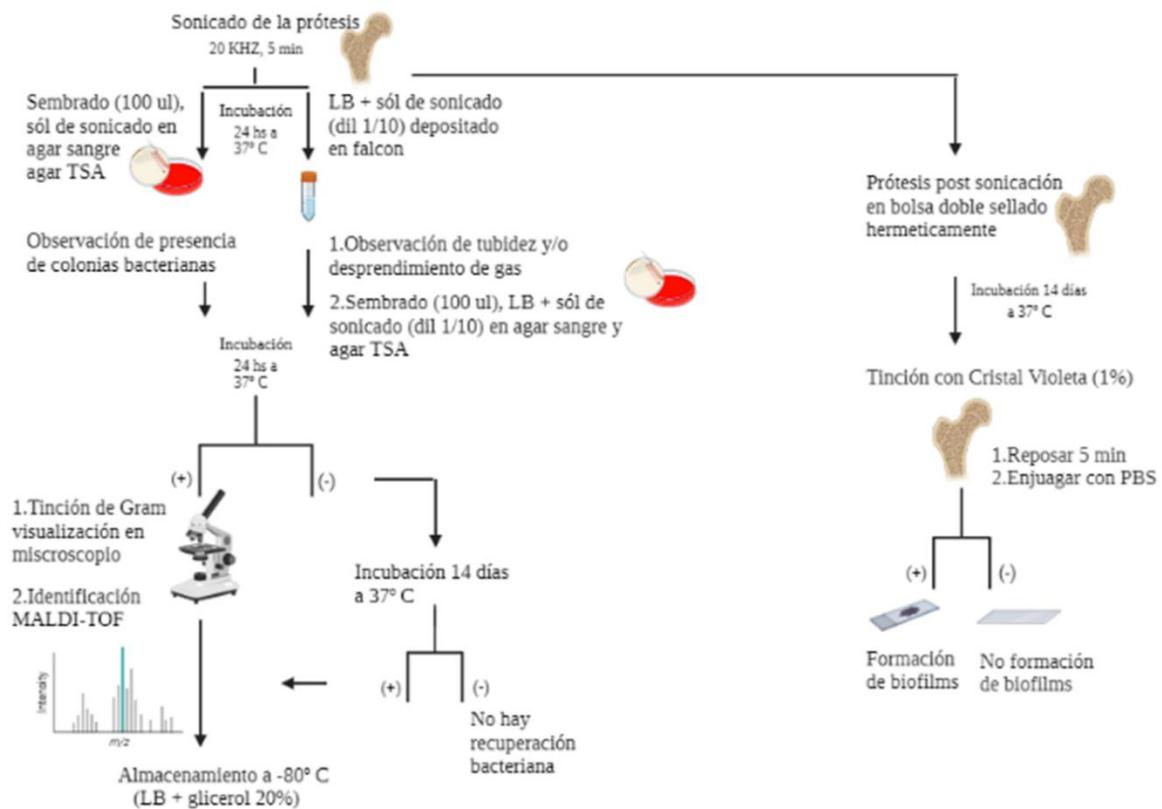


Figura 5. Esquema de trabajo para el procesamiento de las prótesis de cadera.

4.3.2 Análisis de la formación de biofilm sobre la prótesis de cadera

Luego de transcurridos los 14 días de incubación (tiempo de incubación total de ensayo si no hubo presencia bacteriana en placa) o inmediatamente después de detectar la presencia de una colonia bacteriana en placa, cada una de las prótesis fue teñida con cristal violeta 1%. La prótesis que se encontraba dentro de la bolsa estéril sellada en el buffer de sonicado, se depositó sobre una superficie estéril, se le agregó el colorante y se incubó durante 5 minutos. El cristal violeta fue previamente filtrado para su uso, luego de transcurridos los 5 minutos, se enjuagó con PBS para eliminar el exceso de colorante sobre la prótesis (ver Figura 6). En presencia de adherencias sobre el dispositivo (formación de biofilms indicado con flechas amarillas, Figura 6) con un bisturí se raspó sobre la superficie de la prótesis, se colocó sobre un portaobjetos que contenía una gota de agua, se homogenizó y extendió para su visualización directa en Microscopio Óptico.

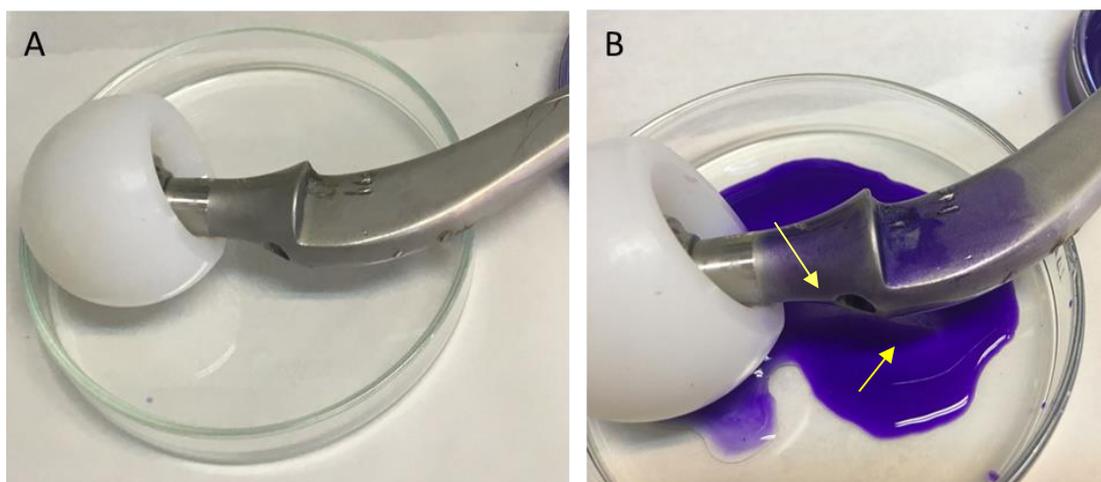


Figura 6. Prótesis de cadera teñida con cristal violeta para la determinación de biofilm *in situ*. Luego de incubación a 37°C, durante 14 días en caso de no detectarse la presencia bacteriana en placa o inmediatamente después de detectarse la presencia bacteriana en placa **A-** prótesis previa a la tinción con cristal violeta; **B-** prótesis teñida con cristal violeta (incubación de 5 minutos y posterior enjuague con PBS). Resultado positivo para la presencia de biofilm *in situ*.

4.3.3 Identificación de los agentes etiológicos

Cuando se detectó crecimiento bacteriano en las placas de TSA y/o AS, se realizó la prueba de Gram que permite una rápida clasificación del agente etiológico. Luego, con el fin de obtener un cultivo puro, se reaislaron la o las colonias utilizando un medio sólido no selectivo TSA o AS, el cual fue incubado por 24 horas a 37°C.

Su posterior identificación se realizó utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF, esta metodología automatizada permite reducir notoriamente el periodo de tiempo de identificación bacteriana (Cercenado, 2017; P. García et al., 2012; Jordana-Lluch et al., 2012), el equipo utilizado fue Bruker Daltonik microflex del Instituto de Higiene. La identificación precisa de los microorganismos permite el estudio de su sensibilidad a los antibióticos, lo cual resulta crucial para tratar con éxito las infecciones de prótesis de cadera (Le Vavasseur & Zeller, 2022).

El MALDI-TOF produce, separa y detecta los iones en fase gaseosa y está conformado por una fuente de ionización (láser ultravioleta con longitud de onda de 337 nm), que produce la desorción e ionización de la muestra con la ayuda de una matriz orgánica (Abonnenc et al., 2010). La placa contiene 96 pocillos, la muestra analizada se mezcla con 1 µl de matriz orgánica fotosensible, en nuestro caso se utilizó ácido α -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico (HCCA), se deposita sobre una placa metálica y se deja secar a temperatura ambiente unos minutos (absorción) (Abonnenc et al., 2010; Artini et al., 2011; Bizzini et al., 2010; Carbonnelle & Raskine, 2011). Tras la ionización, los iones generados se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador que separa los iones procedentes de la muestra en relación con su ratio masa/carga (m/z). Este ratio determina el tiempo que tarda un ion en alcanzar el detector (tiempo de vuelo) (Jordana-Lluch et al., 2012). Finalmente, los iones impactan contra el detector, que recoge toda la información necesaria para generar un espectro de masas de cada compuesto analizado. El método de identificación mediante MALDI-TOF se basa en análisis del espectro proteico generado por un microorganismo y la comparación de su espectro con los perfiles proteicos existentes en la base de datos. Después del análisis, el software proporciona no solo el resultado de identificación sino también el grado de fiabilidad de dicha identificación. Para Bruker Daltonik microflex existen 3 principales niveles de fiabilidad: A, identificación fiable a nivel tanto de género como de especie (“score value” ≥ 2); B, identificación fiable a nivel de género (“score value” 1,7-1,9); C,

identificación poco fiable (“score value < 1,7”) no se entrega identificación (P. García et al., 2012).

4.3.4 Almacenamiento de las cepas

Cada una de las cepas fue reaislada en medio TSA o AS e incubadas 24 horas a 37°C posteriormente a su identificación por MALDI-TOF. Estas cepas fueron conservadas en caldo Luria-Bertani y glicerol (20%) a -80°C por duplicado en el IIBCE y en el Instituto de Higiene (modificado de Arciola et al., 2005).

4.3.5 Cuantificación de la biomasa de biofilms *in vitro*

Para la cuantificación de los biofilms *in vitro*, cada cepa almacenada a -80°C se sembró en una placa de TSA y se incubó por 24 horas. Posteriormente, se realizaron pre-cultivos en medio líquido LB (5 mL) durante 24 horas, de forma de obtener un solo pre-cultivo fresco para cada cepa. Para evaluar el crecimiento del biofilm, se evaluaron 2 medios de cultivo, TSB y TSB + glucosa 1%. Se adicionaron 180 µl de medio TSB o TSB + glucosa 1% a una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (O’Toole, 2011) y posteriormente se inocularon 20 µl de pre-cultivo bacteriano y se incubaron a 37°C. Cada fila de la placa correspondió a una cepa que se sembró por triplicado para cada uno de los dos medios analizados (TSB y TSB + glucosa 1%). La primera fila de la placa correspondió al blanco: TSB o TSB + glucosa 1% carente de inóculo bacteriano. Estas placas fueron incubadas por 24 y 48 horas. Cumplido ese tiempo se eliminaron las bacterias planctónicas, retirando el medio y lavando tres veces con 200 µl de PBS. Luego se agregaron 200 µl de cristal violeta 1%, se dejó reposar durante 15 minutos y luego se lavaron posteriormente con PBS de forma de retirar el exceso de cristal violeta 1%. El cristal violeta 1% que queda retenido en el biofilm y en la matriz extracelular es solubilizado mediante el agregado de 200 µl de etanol 95%. Se dejó en agitación suave durante 5 minutos para facilitar la solubilización de los biofilms, en la Figura 7 se muestra el diseño experimental de placa utilizado.

La cuantificación se realizó a través de la medida de la densidad óptica (DO) de cada pocillo (con el etanol incluido) a 590 nm por espectrofotometría

empleando el equipo Varioskan™ Flash Multimode Reader. Esto permite obtener una medida semi-cuantitativa de la cantidad de biomasa de los biofilms.

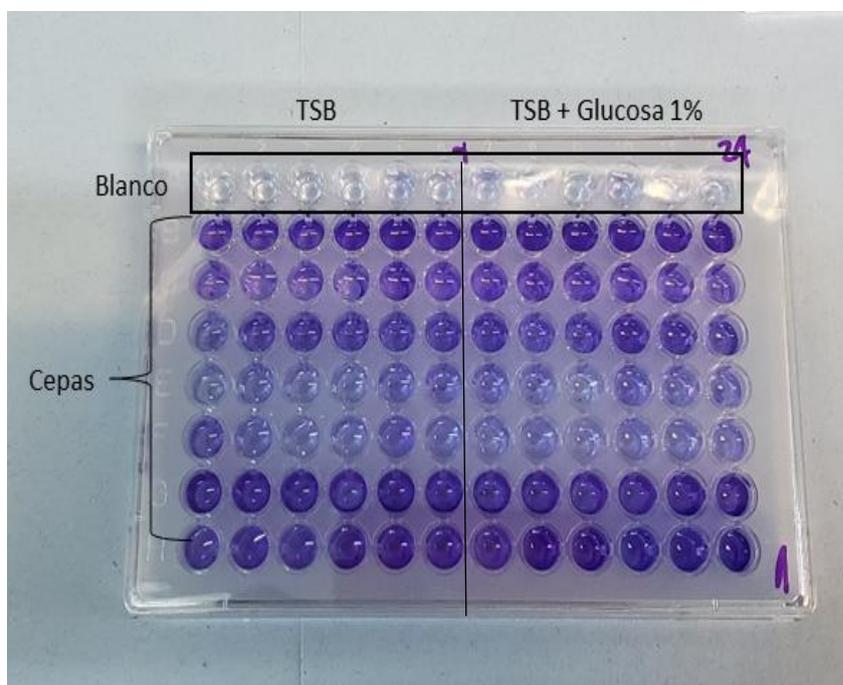


Figura 7. Placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos para ensayo de semi cuantificación de la biomasa de biofilm. Evaluación de medio de incubación TSB vs TSB + Glucosa 1%, considerando tiempo final de incubación 24 y 48 horas.

Según Villegas et al., (2013) la formación del biofilm se puede clasificar comparando la absorbancia de los pocillos con biofilms (DO) con la absorbancia en el pocillo control o blanco sin bacterias (DOc). La clasificación establece los puntos de corte en $DO \leq DOc$: no formadora; $DOc < DO \leq (2 \times DOc)$: leve; $(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$: moderada; y $(4 \times DOc) < DO$: fuerte.

Como control de crecimiento y de formación de biofilm se utilizó una cepa de referencia de *Staphylococcus aureus*, subsp. *aureus* *Rosenbach* (ATCC 6538) (Artini et al., 2011) perteneciente a la colección de cepas del Laboratorio de Biofilms microbianos del IIBCE, la misma posee fuerte capacidad formadora de biofilm. Debido a la significancia de *Staphylococcus* spp como principal agente etiológico responsable de las infecciones en prótesis de cadera los posteriores análisis se realizaron solo utilizando este género bacteriano.

4.3.6 Susceptibilidad antibiótica en células planctónicas

4.3.6.1 Antibiograma por disco difusión

El estudio de la susceptibilidad a los antibióticos de las cepas planctónicas de *Staphylococcus* spp., se realizó mediante antibiograma por disco difusión, de acuerdo con las directrices del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2021). Se seleccionaron los aislamientos del género *Staphylococcus* por ser los más frecuentes y en los que luego se realizaron los ensayos de inhibición de la formación de biofilm con antibióticos. Estas cepas almacenadas a -80°C fueron recuperadas en TSA e incubadas por 24 horas a 37°C . Se realizó una suspensión bacteriana con una turbidez 0.5 de la escala de Mc. Farland (lo que corresponde a $1-5 \times 10^8$ UFC/ml). Para esto se tomaron colonias a partir de un cultivo puro en TSA, se resuspendieron en suero fisiológico estéril y se midió su turbidez. Luego se embebió un hisopo en la suspensión bacteriana y se realizó una siembra de manera confluyente, en tres direcciones en el medio agar Müller-Hilton (Ramessar & Olaniran, 2019). Los antibióticos ensayados fueron cefoxitina (FOX), gentamicina (GM), trimetoprim sulfametoxazol (TMP-SMX), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (E) y clindamicina (CLI). Los resultados se expresaron como: Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R) midiendo el halo de inhibición de crecimiento y utilizando las tablas del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2021) para su interpretación. Los aislamientos resistentes a cefoxitina se definieron como (SAMR) y los sensibles a este antibiótico como (SAMS). Se definió como multirresistentes a aquellos SAMR o SAMS con resistencia a 2 o más familias de antibióticos, además de los β -lactámicos (Drago et al., 2019). Además, se registró cuando las cepas presentaron resistencia inducible a clindamicina. Algunos macrólidos son inductores de la expresión de resistencia a clindamicina en *S. aureus*, por lo cual los discos de clindamicina y eritromicina fueron colocados a una distancia de 1,5 cm para la búsqueda de dichos fenotipos inducibles. Cuando se colocan cerca los discos con estos antibióticos, si existe inducción se observa el aplanamiento en el halo de inhibición para clindamicina (efecto D) (Kader et al., 2005).

4.3.6.2 Elipsograma

Para el estudio de susceptibilidad a vancomicina se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), mediante elipsograma, de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI. Para la preparación del inóculo se realizó el mismo procedimiento descrito en 4.3.6.1. Una vez inoculada la placa de Muller-Hilton se coloca de forma central la tira de vancomicina. Se incuba entre 18-24 horas a 37°C y se procede a su lectura. El valor de la tira donde el halo de inhibición de crecimiento entra en contacto es la CIM. La misma se lee utilizando las tablas del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2021) para su interpretación.

4.3.7 Efecto de los antibióticos sobre la inhibición en la formación de biofilms *in vitro*

Para estos ensayos solo se seleccionaron las cepas de *Staphylococcus* spp. ya que fueron los agentes etiológicos identificados con mayor frecuencia en las muestras clínicas analizadas. La técnica empleada es una modificación de la anteriormente descrita en el punto 4.3.5. Para estos ensayos se utilizó medio TSB + glucosa 1% en una placa de poliestireno de 96 pocillos. La primera fila de la placa corresponde al blanco del experimento. De este modo la placa quedó dividida en 4 partes iguales para el ensayo. En los pocillos de las siguientes filas (de la B –H) se sembraron con la suspensión de los aislamientos de *Staphylococcus* a estudiar, sobre el medio con el antibiótico. El antibiótico es puesto en la placa a tiempo 0, ya que este es un ensayo de inhibición (Figura 8).

La cuantificación del biofilm bajo el efecto del antibiótico se realizó a las 24 horas de incubación. Los antibióticos evaluados fueron gentamicina, ciprofloxacina, clindamicina y vancomicina y fueron testeados a 3 concentraciones (Tabla 1). Los mismos representan los grupos de antibióticos más comúnmente usados para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus*. Las concentraciones de antibiótico que se estudiaron fueron definidas de acuerdo a la concentración que alcanzan dichos antibióticos en la cavidad articular o hueso, con las dosis utilizadas habitualmente de forma intravenosa para gentamicina, clindamicina y ciprofloxacina (Gerding et al., 1996; Thabit et al., 2019). Con respecto a la

vancomicina, en el Banco de Prótesis de Uruguay, como protocolo utilizan para la colocación de una prótesis de cadera el cemento embebido con 2g de vancomicina cada 40g de cemento y esto en relación al peso del paciente. De ahí que la elección de la concentración de vancomicina seleccionada fue en relación a esta dosis de uso local. Cada ensayo se realizó por triplicado y tres veces de manera independiente. Los resultados obtenidos se compararon usando test estadístico de Kruskal-Wallis y se consideró significativo cuando el valor $p < 0.05$.

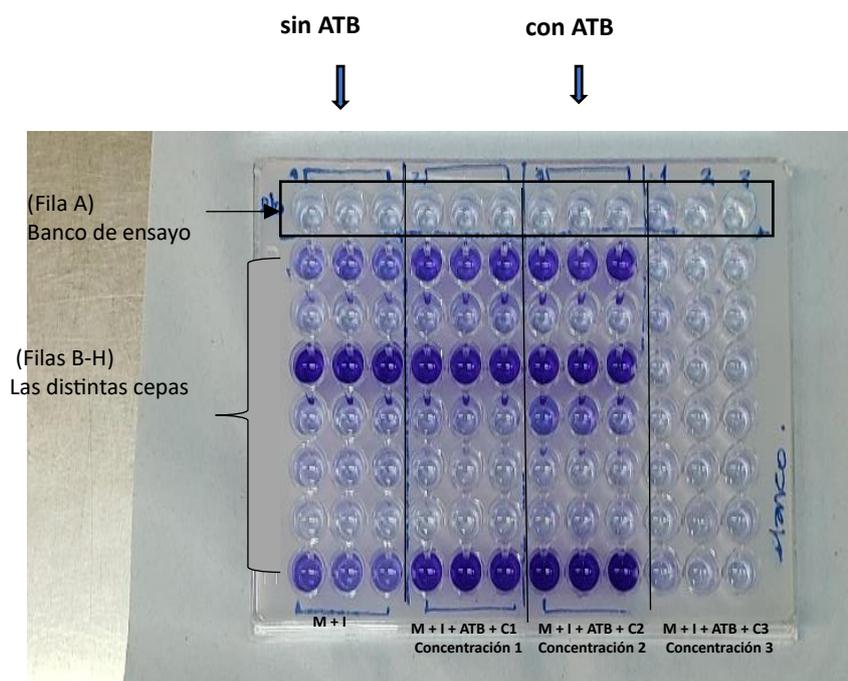


Figura 8. Placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos en ensayo de inhibición. El biofilm es teñido con cristal violeta y luego solubilizado con etanol para su lectura (DO a 590nm) en varioskan. La placa se divide en 4 columnas (cada columna involucra 3 pocillos de la placa). La primera columna corresponde al control negativo (**sin ATB**), allí está el medio de incubación (**M**) y el inóculo bacteriano (**I**). Las otras tres columnas (**con ATB**) tienen el medio de incubación (**M**), el inóculo bacteriano (**I**) y las concentraciones de antibiótico a testear **ATB concentración 1 (C1)**, **(C2)** y **(C3)** en orden creciente de izquierda a derecha.

Tabla 1. Antibióticos, mecanismo de acción y concentraciones testeadas.

Antibióticos	Familia	Mecanismo de acción	Concentraciones testeadas (µg/ml)		
Gentamicina	Aminoglucósido	Inhibición de la síntesis de proteínas	8	16	32
Ciprofloxacina	Quinolona	Inhibición de la replicación del ADN	1	2	4
Clindamicina	Lincosamida	Inhibición de la síntesis de proteínas	1	2	4
Vancomicina	Glicopéptido	Inhibición de la síntesis de la pared celular	100	500	1500

4.3.8 Búsqueda de genes que codifican para factores de virulencia en *Staphylococcus* spp.

Se evaluó la presencia de genes que codifican para factores de virulencia en *Staphylococcus* mediante PCR en tiempo final.

4.3.8.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos de los aislamientos de *Staphylococcus* se realizó mediante lisis por calor con la enzima achromopeptidasa (Leonard & Carroll, 1997). Para ello, a partir de un cultivo puro en TSA agar, se tomó una colonia y se resuspendió en la suspensión de achromopeptidasa 2 U/µL. Se incubó a 94°C por 10 minutos en baño de agua y posteriormente a 55°C por otros 10 minutos en termobloque. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, el sobrenadante de esos extractos se conservó a -20°C y se usó como molde para las reacciones de PCR.

4.3.8.2 Genes asociados a factores de virulencia

Para la detección de genes asociados a factores de virulencia se analizaron la presencia de genes relacionadas con enterotoxinas y leucocidina de Pantone Valentine (*pvl*), capsulares (*cap 5* y *8*), proteínas de unión a fibronectina FnBPs (FnBPA y FnBPB), factores de agregación o *clumping* (Clf A), adhesina intercelular polisacáridica (PIA) codificadas por el operón *ica* ABDC, proteínas de unión al colágeno (*cna*) y superóxido-dismutasa (SodA). Estos genes fueron elegidos dada su relevancia en *Staphylococcus* spp. y se ha reportado que varios de ellos podrían estar implicados en la formación de biofilms (Cervantes-García et al., 2014; Geoghegan et al., 2010; Heilbronner et al., 2011; Lina et al., 1999; Morandi et al., 2009; Nilsson et al., 1998; Reinoso et al., 2008).

La mezcla de reacción utilizada (mix de PCR) con un volumen final de 25 μ L estuvo compuesta de: 0.5 μ M de cebadores forward y reverse (ver Tabla 2), 0.5 mM de dNTP, 1X Buffer tampón de PCR, 3 mM de MgCl₂; 0.04 U/ μ L de NZYT Taq II polimerasa (5 U/ μ L) a este mix de le adiciona 4 μ L de Molde de ADN (perteneciente a la extracción de las cepas clínicas analizadas, punto 4.3.8.1) (Machado et al., 2020). Se utilizaron como controles de procedimiento ADNs de cepas de *S. aureus*, que contienen los genes de estudio previamente caracterizados en el marco de distintos proyectos a cargo de la Dra. Lorena Pardo en el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. La mezcla de reacciones fue la misma para todos los factores de virulencia y las condiciones de amplificación se describen en Tabla 2.

Mediante la técnica de electroforesis se visualizó la presencia de los genes para los factores de virulencia buscados utilizando geles de agarosa 1,5%, 120 volts a 35 mAmps durante 50 minutos. Para revelar el gel, se utilizó bromuro de etidio y se visualizó mediante luz UV.

Tabla 2. Genes asociados a factores de virulencia analizados por PCR en tiempo final, secuencias de los primers, tamaño de los amplicones y variaciones en la temperatura de melting para cada uno de ellos.

Nombre del primer	Tamaño del amplicón	Secuencia	Temperatura de melting (°C)	Referencias
<i>cap5</i> (F)	340 pb	GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG	57	(Ambroggio et al., 2018)
<i>cap5</i> (R)		ACTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG		
<i>cap8</i> (F)	867 pb	TGTGGGATTTTTGTAGCTTT	55	(Ambroggio et al., 2018)
<i>cap8</i> (R)		CGGGTGACTAAAAATACTCG		
<i>fnbA</i> (F)	191 pb	GATACAAACCCAGGTGGTGG	55	(Arciola et al., 2005)
<i>fnbA</i> (R)		TGTGCTTGACCATGCTCTTC		
<i>fnbB</i> (F)	201 pb	TGTGCTTGACCATGCTCTTC	55	(Arciola et al., 2005)
<i>fnbB</i> (R)		AGTTGATGTCGCGCTGTATG		
<i>icaA</i> (F)	188 pb	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	57	(Arciola et al., 2001)
<i>icaA</i> (R)		TCAGGCACTAACATCCAGCA		
<i>icaD</i> (F)	198 pb	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	55	(Arciola et al., 2001)
<i>icaD</i> (R)		CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
<i>icaB</i> (F)	140 pb	CCATCCAGTGTGCTTACAGGC	60	(Cerca et al., 2007)
<i>icaB</i> (R)		TCCATTAAGAGATGGGACGGATTCC		
<i>clfA</i> (F)	638 pb	GCAAAATCCAGCACAAACAGGAAACGA	60	(Mason et al., 2001)
<i>clfA</i> (R)		CTTGATCTCCAGCCATAATTGGTGG		
<i>sodA</i> (F)	900 pb	AGGCCATTGGTCGTATTT	55	(Valderas et al., 2002)
<i>sodA</i> (R)		GCAAATCATCTAAGGGCTATG		
<i>cna</i> (F)	192 pb	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA	55	(Arciola et al., 2005)
<i>cna</i> (R)		AGTGCCTTCCCAAACCTTTT		
<i>pvl</i> (F)	433 pb	CGAGACCAAGATTCAATAAC	55	(Havaei et al., 2010)
<i>pvl</i> (R)		AAAGAAAACCACTCACATCACA		

4.4 Análisis de datos

Debido a que los datos no cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para utilizar estadística paramétrica, se emplearon técnicas de estadística no-paramétrica, utilizando el programa R v. 4.1.3 (R Development Core

Team, 2022). Para analizar las diferencias en la formación de biofilm entre los medios de cultivo y los tiempos de incubación, se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon utilizando la función `wilcox.test` del paquete base de R. Para analizar el efecto de los antibióticos sobre la biomasa de los biofilms, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis empleando la función `kruskal.test` del paquete base de R. Como test *a posteriori* de comparaciones múltiples, se utilizó la prueba de Dunn utilizando la función `Dunn Test` del paquete FSA (Ogle et al., 2021) de R. Para analizar diferencias en la biomasa del biofilm de las cepas sensibles y resistentes con relación al tipo de antibiótico y a las distintas concentraciones de ensayo, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de Dunn se empleó como test de comparaciones múltiples *a posteriori*.

5. Resultados

5.1 Aislamiento e identificación bacteriana a partir de prótesis articulares

En el Departamento de Microbiología en el período comprendido entre 2019-2021, se recibieron 21 prótesis de cadera. Las mismas fueron extraídas de pacientes con sospecha clínica de infección en el dispositivo. La recuperación bacteriana, se realizó utilizando la sonicación y esta técnica permitió el aislamiento bacteriano en 15 de las prótesis analizadas (71,4%). Sin embargo, el total de microorganismos recuperados fue de 16, ya que de una misma prótesis se obtuvieron dos aislamientos. En la Tabla 3 se describen los microorganismos identificados mediante MALDI-TOF con un score ≥ 2 clase A, resultado confiable para Género y especie. Indica máxima fiabilidad para la identificación de microorganismos según el fabricante para la plataforma utilizada (Bruker Daltonik microflex). También se muestran los resultados obtenidos de la visualización de los biofilms sobre las prótesis mediante tinción con cristal violeta.

Tabla 3. Identificación de los microorganismos recuperados mediante sonicado y presencia de biofilm sobre las prótesis articulares de cadera.

Muestra	Crecimiento bacteriano	Identificación MALDI-TOF	Biofilm en prótesis (cristal violeta)	Raspado de adherencias sobre prótesis
Muestra 1	Negativo	-	Negativo	No
Muestra 2	Positivo	<i>S. aureus</i>	Positivo	Si
Muestra 3	Positivo	<i>K. pneumoniae</i>	Positivo	Si
Muestra 4	Positivo	<i>Corynebacterium xerosis</i>	Positivo	Si
Muestra 5	Positivo	<i>S. aureus</i>	Positivo	Si
Muestra 6	Positivo	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	Si
Muestra 7	Positivo	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	Si
Muestra 8	Positivo	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	Si
Muestra 9	Positivo	<i>S. epidermidis</i>	Negativo	No
Muestra 10	Negativo	-	Negativo	No
Muestra 11	Negativo	-	Negativo	No
Muestra 12	Positivo	<i>S. aureus</i> (A) / <i>P. aeruginosa</i> (B)	Positivo	Si
Muestra 13	Negativo	-	Negativo	No
Muestra 14	Negativo	-	Negativo	No
Muestra 15	Positivo	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	Si
Muestra 16	Positivo	<i>S. aureus</i>	Positivo	Si
Muestra 17	Positivo	<i>S. aureus</i>	Positivo	Si
Muestra 18	Positivo	<i>S. aureus</i>	Positivo	Si
Muestra 19	Positivo	<i>Corynebacterium xerosis</i>	Positivo	Si
Muestra 20	Positivo	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	Si
Muestra 21	Negativo	-	Negativo	No

Muestra 12: agente etiológico *S. aureus* = **A**; Muestra 12: agente etiológico *P. aeruginosa*= **B**.

Staphylococcus spp. fue el agente etiológico aislado con mayor frecuencia, 12 de los 16 (75%) microorganismos recuperados corresponden a dicho género. Seis correspondieron a *Staphylococcus aureus* y 6 a *Staphylococcus epidermidis*. Lo siguen *Corynebacterium xerosis* con 2 aislamientos (12.5%), *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* con 1 aislamiento cada uno (6.25%, Figura 9).

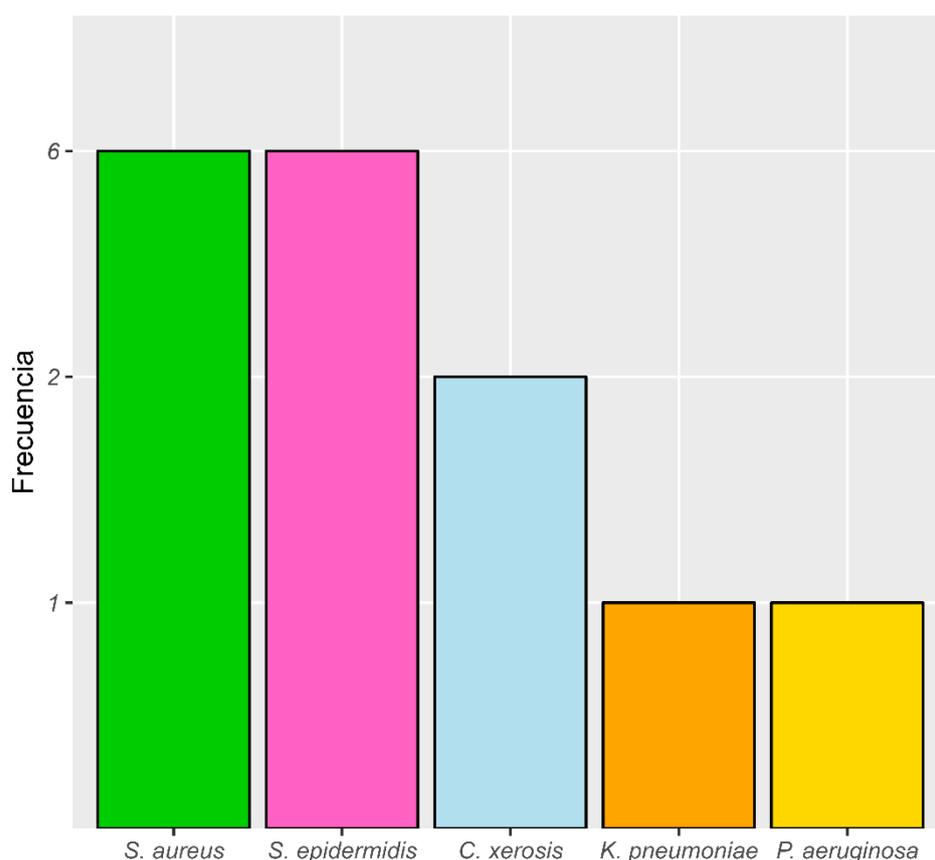


Figura 9. Frecuencia absoluta de los microorganismos recuperados a partir de 15 prótesis articulares de cadera removidas quirúrgicamente de pacientes con sospecha de infección.

5.2 Detección de biofilm utilizando Cristal Violeta sobre la prótesis articular

De las 21 prótesis analizadas, 14 presentaron formación de biofilm *in situ*. En todas ellas se identificó un agente etiológico. Sin embargo, en una muestra donde no se evidenció biofilm *in situ* se aisló a *S. epidermidis* (Tabla 3). En la Figura 10 A, se muestra

la prótesis utilizada como control negativo de biofilm, previo a la tinción con cristal violeta. La misma fue facilitada por los traumatólogos del Banco de Prótesis Uruguay, en condiciones de esterilidad y elegida de forma aleatoria para su análisis. En la Figura 10 B, se muestra la prótesis teñida con cristal violeta (5 min de incubación) y en la Figura C, se muestra la prótesis teñida con cristal violeta posterior al lavado con PBS (para eliminar el exceso del colorante). En la Figura 10 D, E y F, pueden observarse tres prótesis de pacientes con infección, teñidas con el colorante, incubadas durante 5 minutos y posterior lavado con PBS. Sobre la superficie de dichos dispositivos se observa el biofilm.

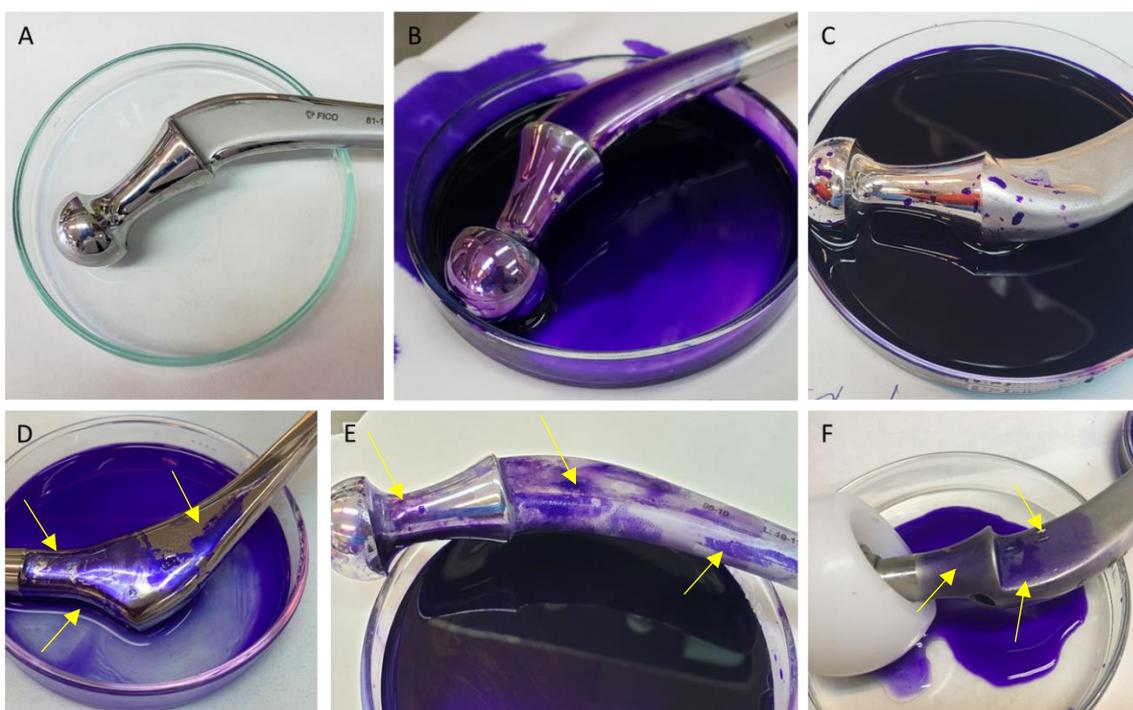


Figura 10. Ensayo de evaluación de la presencia de biofilm sobre prótesis de cadera con cristal violeta. **A-** prótesis estéril previo tinción con cristal violeta. **B-** prótesis teñida con cristal violeta con incubación de 5 minutos. **C-** prótesis posterior al lavado con PBS (para la eliminación del colorante en exceso). **D, E y F-** prótesis removidas quirúrgicamente en las que se evidencia formación de biofilm en su superficie luego de la tinción con cristal violeta y lavado con PBS. Las flechas amarillas indican la presencia de biofilm adherido sobre la superficie de los dispositivos.

Posteriormente se realizó el raspado del biofilm presente en la superficie de la prótesis y se visualizó al microscopio. A continuación, se muestran dos preparados de raspado de biofilm de dispositivos que evidenciaron adherencias luego de la tinción con cristal violeta (Figura 11).

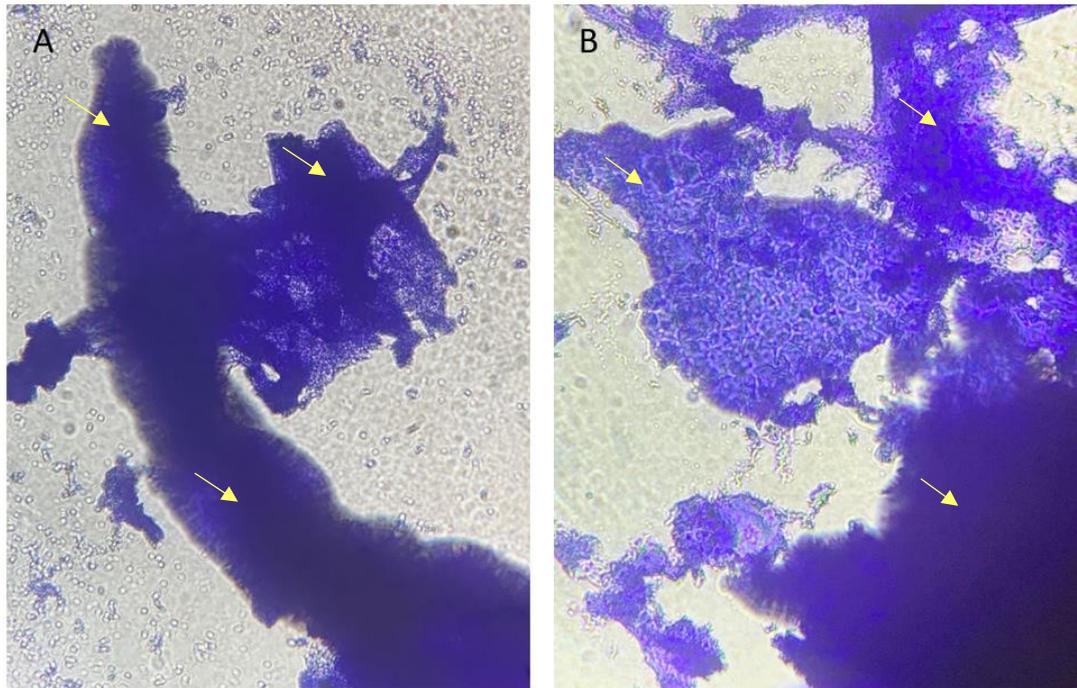


Figura 11. Raspado de biofilm en superficie de prótesis articular post tinción con cristal violeta. Microscopio óptico aumento 100 X. En flechas amarillas se observa el biofilm.

5.3 Determinación de la capacidad formadora de biofilm de las bacterias aisladas

5.3.1 Modelo estático de formación de biofilm sobre placa de microtitulación

En primera instancia evaluamos dos medios de cultivo para la formación de biofilm a dos tiempos de incubación, Para ello utilizamos el modelo estático de formación de biofilm que consiste en el crecimiento de las bacterias en placas de microtitulación incubadas a 37°C durante el tiempo del ensayo. Transcurrido ese tiempo de incubación, se retira el medio y las células planctónicas. Se agrega cristal violeta, se incuba, se retira el exceso del colorante y el cristal violeta adherido al biofilm se solubiliza con etanol. La biomasa del biofilm se semi-cuantifica midiendo la densidad óptica (DO) a 590nm. Para la puesta a punto del método se utilizó como control positivo de crecimiento la cepa ATCC (6538) de *Staphylococcus aureus* fuerte formadora de biofilms y además se utilizó

todo el stock de cepas. Se comparó la biomasa del biofilm en medio TSB y TSB + Glucosa 1% en relación a los tiempos de incubación de 24 y 48 horas. En medio de cultivo TSB se observó un incremento significativo de la biomasa del biofilm a 48 horas comparado con 24 horas (Tabla 4). Sin embargo, al utilizar TSB + Glucosa 1% como medio de cultivo, la biomasa de los biofilms no varió significativamente entre los tiempos de incubación de 24 y 48 horas (Tabla 4). Al comparar ambos medios de cultivo a las 24 y 48 horas observamos que a las 24 horas hay un incremento significativo en TSB + Glucosa 1% comparado con el obtenido en TSB. Mientras que a las 48 horas no se observan diferencias significativas en la formación de biofilms entre ambos medios (Tabla 4, Figura Suplementaria S1). A partir de estos resultados es que la formación de biofilms se evaluará utilizando TSB + Glucosa 1% a 24 horas.

Tabla 4. Evaluación de las condiciones óptimas para la formación de biofilms. Los datos corresponden a los valores de densidad óptica medidos a 590 nm. W: estadístico del test de suma de rangos de Wilcoxon, valor de p significativo <0.05.

	TSB Mediana (rango)	TSB + Glucosa Mediana (rango)	W, p-valor
24 horas	0.434 (0.060-6.270)	0.768 (0.088-7.207)	12856, 0.0007
48 horas	0.655 (0.118-6.301)	0.742 (0.141-5.297)	14826, 0.1643
W, p-valor	13002, 0.0014	15712, 0.6215	

Para clasificar la capacidad formadora de biofilms de las cepas se aplica el criterio de Villegas et al (2013) el cual permite agrupar a los microorganismos en no formador (NF), leve formador (LF), moderado formador (MF) y fuerte formador de biofilms (FF) (Tabla 5). Cabe la pena aclarar que por motivos de laboratorio se trabajó con 14 de las 16 cepas recuperadas.

Tabla 5. Criterio de clasificación según Villegas et al., (2013) para la capacidad formadora de biofilms.

Clasificación de biofilms	DOc= 0.0466	Valores
No formador (NF)	$DO \leq DOc$	0.05
Leve formador (LF)	$DOc < DO \leq (2 \times DOc)$	$0.05 < X \leq 0.1$
Moderado formador (MF)	$(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$	$0.1 < X \leq 0.2$
Fuerte formador (FF)	$(4 \times DOc) < DO$	> 0.2

DO: es la densidad óptica medida a 590nm. DOc: es la densidad óptica del blanco del ensayo.

Utilizando el criterio de Villegas et al. (2013), 13/14 cepas se clasificaron como fuerte formadoras de biofilm en las condiciones de ensayo, la restante fue clasificada como moderada formadora (Tabla Suplementaria S2). Dicha cepa corresponde a la prótesis en la que no se observó biofilm *in situ* cuando se realizó la coloración de cristal violeta. En la Figura 12 se muestra la clasificación de los microorganismos aislados según la capacidad formadora de biofilms utilizando el criterio de Villegas et al. (2013). Para este experimento fueron utilizadas 14 cepas de las 16 identificadas inicialmente y se continuará así durante el resto del trabajo.

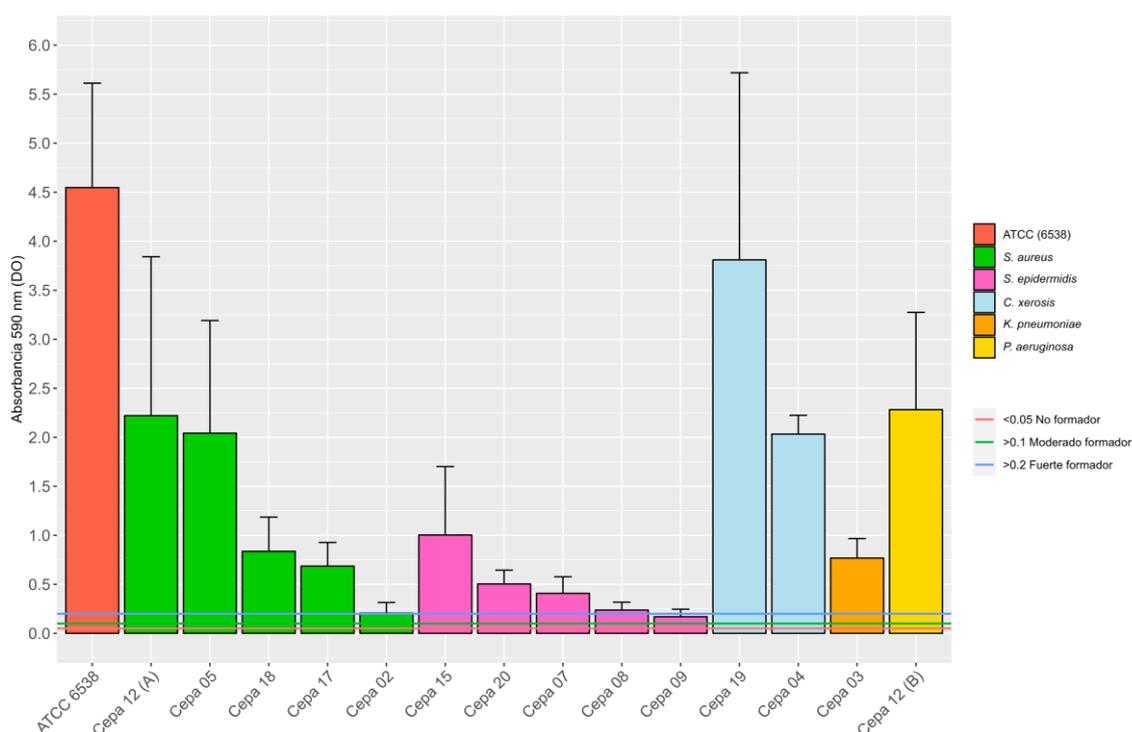


Figura 12. Clasificación de las cepas según su capacidad de formar biofilms, de acuerdo a Villegas et al (2013). La línea roja, verde y azul marcan los límites para la clasificación de los microorganismos en no formador, leve, moderado y fuerte formador de biofilm respectivamente.

Muestra 12: Agente etiológico *S. aureus* = **A**; Muestra 12: Agente etiológico *P. aeruginosa* = **B**

Muestra 6 (*S. epidermidis*) y **Muestra 16** (*S. aureus*) no fueron incluidas en este ensayo, tampoco en lo que sigue de este trabajo.

5.4 Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas

La susceptibilidad antibiótica se estudió en 10 cepas de *Staphylococcus spp.* mediante antibiograma. Tres cepas fueron meticilino resistentes (2, *S. aureus* y 1, *S. epidermidis*) asociando también resistencia a otras familias de antibióticos multirresistentes (Tabla 6). La mayoría de las cepas analizadas mostraron resistencia a gentamicina (7/10), en menor medida a ciprofloxacina (5/10), trimetoprim sulfametoxazol y eritromicina (4/10), clindamicina (3/10) y una cepa con resistencia inducible a clindamicina (Tabla 6, Figura 13). Para la sensibilidad a vancomicina se determinó la CIM mediante elipsograma siendo todas las cepas sensibles a este antibiótico (10/10) (Figura 14).

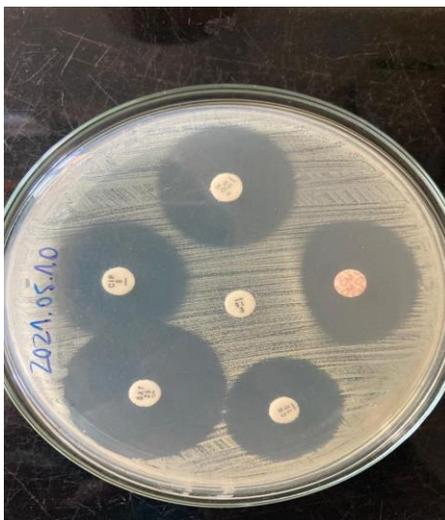


Figura 13. Antibiograma por disco difusión en una cepa de *S. aureus* aislada de un paciente con infección de prótesis de cadera. Efecto D (ver disco en la parte superior derecha de la placa) con halo de inhibición en forma de D, dado por la eritromicina como inductor de la expresión de la resistencia.



Figura 14. Determinación de la CIM para vancomicina mediante Elipsograma en una cepa de *S. aureus* aislada de paciente con infección de prótesis de cadera. La muestra es sensible a vancomicina CIM 0.50 µg/ml.

Tabla 6. Resistencia y sensibilidad de células planctónicas (antibiograma y elipsograma).

Cepa	Gentamicina (CN)	Ciprofloxacina (CIP)	Trimetoprim sulfametoxazol (SXT)	Vancomicina (V)	Eritromicina (E)	Clindamicina (CM)	Cefoxitina (FOX)	Observaciones
Cepa 12 (<i>S. aureus</i>)	R	R	R	S	R	R	R	SAMR, Multiresistente
Cepa 2 (<i>S. aureus</i>)	R	R	R	S	R	R	S	SAMS, Multiresistente
Cepa 5 (<i>S. aureus</i>)	R	R	S	S	S	S	R	SAMR, Multiresistente
Cepa 17 (<i>S. aureus</i>)	R	S	S	S	S	S	S	
Cepa 18 (<i>S. aureus</i>)	S	S	S	S	R	S	S	SAMS, Test D (+) RI
Cepa 7 (<i>S. epidermidis</i>)	R	R	R	S	R	R	R	Meticilino resistente, Multiresistente
Cepa 15 (<i>S. epidermidis</i>)	R	R	S	S	S	S	S	
Cepa 9 (<i>S. epidermidis</i>)	S	S	R	S	S	S	S	
Cepa 20 (<i>S. epidermidis</i>)	R	S	S	S	S	S	S	
Cepa 8 (<i>S. epidermidis</i>)	S	S	S	S	S	S	S	
Total	7 R	5 R	4 R	0 R	4 R	3 R	3 R	

SAMR *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. SAMS *Staphylococcus aureus* meticilino sensible. RI Resistencia inducible a clindamicina. Test D (+) indica que la cepa presentó resistencia inducible a clindamicina.

5.5 Efecto de los distintos antibióticos sobre la formación de biofilms

Luego de tener caracterizadas las cepas según su capacidad formadora de biofilms, evaluamos el efecto que produce el agregado de distintos antibióticos en la formación de biofilms. Distintas concentraciones de antibióticos se adicionaron junto con los microorganismos, a tiempo 0, en el ensayo de inhibición de biofilm. Los antibióticos utilizados fueron gentamicina, ciprofloxacina, clindamicina y vancomicina (Tabla 7, Figura Suplementaria S3).

El efecto de los antibióticos sobre la biomasa de los biofilms varió en relación con el antibiótico empleado y la concentración testada. Para determinar el valor de esta significancia se utilizó el test de Kruskal-Wallis y para analizar las diferencias entre las distintas concentraciones para cada antibiótico, se utilizó el test de comparaciones múltiples de Dunn *a posteriori*.

El tratamiento con gentamicina mostró una reducción significativa de la biomasa de biofilm, a partir de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tabla 7, Figura Suplementaria S3). Tanto la ciprofloxacina como la vancomicina mostraron una reducción significativa de la biomasa de biofilm en las tres concentraciones testadas. El uso de clindamicina no afectó la biomasa del biofilm en ninguna concentración (Tabla 7, Figura Suplementaria S3).

Tabla 7. Medidas de la densidad óptica a 590 nm. Análisis estadístico del efecto de los antibióticos en la formación de la biomasa del biofilm *in vitro*.

	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Media \pm DS	Kruskal-Wallis (g.l, p-valor)	Dunn Z (p-valor)
Gentamicina	0	2.29 \pm 2.96	8.54 (3, 0.04)	
	8	1.92 \pm 2.31		1.42 (0.93)
	16	1.72 \pm 1.95		0.65 (0.59)
	32	1.41 \pm 1.72		2.91 (<0.05)
Ciprofloxacina	0	2.38 \pm 2.74	16.84 (3, < 0.001)	
	1	1.59 \pm 1.74		3.17 (<0.01)
	2	1.48 \pm 1.65		3.68 (<0.01)
	4	1.15 \pm 0.79		2.74 (<0.05)
Clindamicina	0	3.06 \pm 2.30	4.72 (3, 0.193)	
	1	3.39 \pm 2.54		-0.65 (1.00)
	2	3.15 \pm 2.89		0.35 (1.00)
	4	2.60 \pm 2.38		1.47 (0.85)
Vancomicina	0	2.39 \pm 1.66	102.49 (3, < 0.001)	
	100	0.67 \pm 0.40		8.34 (<0.001)
	500	0.57 \pm 0.39		9.56 (<0.001)
	1500	0.75 \pm 0.44		5.51 (<0.001)

Considerando que en el conjunto de los microorganismos estudiados hay cepas sensibles y resistentes a los antibióticos testeados, nos planteamos conocer si la resistencia en células planctónicas influye en los resultados obtenidos. Para ello separamos las cepas en dos grupos, resistentes o sensibles para cada antibiótico excepto para vancomicina que todas las cepas fueron sensibles. El test de Dunn Z se utilizó para evaluar diferencias significativas en la reducción de la biomasa del biofilm para cada concentración de antibiótico tanto en el grupo de cepas sensibles como resistentes (Tabla 8).

El uso de gentamicina en las cepas resistentes no mostró ningún tipo de variación en la formación del biofilm (Tabla 8, Figura Suplementaria S4). En las cepas sensibles a partir de 16 µg/ ml se observó una disminución significativa de la formación del biofilm (Tabla 8, Figura Suplementaria S4). Con ciprofloxacina, en el grupo de cepas resistentes se observó una disminución significativa de la biomasa del biofilm a concentraciones de 1 µg/ ml y 2 µg/ ml, mientras que a 4 µg/ ml no se observaron diferencias significativas (Tabla 8, Figura Suplementaria S4). En el grupo de cepas sensibles se observó una disminución significativa del biofilm en todas las concentraciones evaluadas con relación al control (Tabla 8, Figura Suplementaria S4). Al evaluar la clindamicina tanto en el grupo de cepas resistentes como sensibles no se observó reducción de la biomasa del biofilm en ninguna de las concentraciones testeadas (Tabla 8, Figura Suplementaria S4).

Tabla 8 Medidas de densidad óptica a 590 nm. Efecto inhibitorio de gentamicina, ciprofloxacina y clindamicina sobre la biomasa del biofilm de cepas sensibles y resistentes.

	Concentración (µg/ml)	DO cepas resistentes	Kruskal-Wallis (g.l, p-valor)	Dunn Z (p-valor)	DO cepas sensibles	Kruskal-Wallis (g.l, p-valor)	Dunn Z (p-valor)
Gentamicina	0	2.47 (±3.01)	4.45 (3, 0.22)		2.47 (±3.01)	27.12 (3, <0.001)	
	8	1.96 (±2.18)		1.02 (1.00)	1.63 (±2.22)		2.49 (0.07)
	16	1.90 (±1.97)		0.58 (1.00)	1.24 (±1.59)		3.35 (<0.05)
	32	1.54 (±1.68)		2.07 (0.23)	1.02 (±1.58)		4.63 (<0.01)
Ciprofloxacina	0	2.65 (±2.93)	18.18 (3, <0.001)		2.65 (±2.93)	42.12 (3, <0.001)	
	1	1.36 (±1.02)		2.65 (<0.05)	1.54 (±2.09)		4.91 (<0.0001)
	2	1.23 (±1.24)		4.02 (<0.001)	1.41 (±1.84)		5.01 (<0.0001)
	4	1.35 (±0.92)		2.00 (0.27)	0.82 (±0.35)		4.18 (<0.001)
Clindamicina	0	3.54 (±3.03)	3.01 (3, 0.39)		3.54 (±3.03)	7.71 (0.05)	
	1	3.50 (±2.60)		-0.47 (1.00)	3.76 (±2.78)		-0.66 (1.00)
	2	2.92 (±2.35)		0.76 (1.00)	3.13 (±2.88)		0.72 (1.00)
	4	2.51 (±2.08)		1.37 (1.00)	2.42 (±2.33)		2.14 (0.18)

5.6 Búsqueda de distintos factores de virulencia en *Staphylococcus spp.* por PCR en tiempo final

Distintos genes de virulencia vinculados al género *Staphylococcus* fueron evaluados mediante PCR en tiempo final en las 10 cepas de este género. Todas las cepas de *Staphylococcus spp.* analizadas reportaron la presencia de al menos uno de los genes que codifican para los factores de virulencia estudiados. Los factores de virulencia mayormente encontrados pertenecieron al grupo de proteínas de superficie y dentro de este, se destaca la presencia de genes asociados a fibronectina, *fnbA* (9/10 cepas), *fnbB* (7/10 cepas). Los genes necesarios para la biosíntesis de PIA (adhesinas intercelulares polisacáridicas) están codificados en el locus *ica* (intercelular adhesión). El operón *ica* está constituido por los genes *icaADBC* que pueden o no estar todos presentes. En los aislamientos estudiados se detectó *icaA* (3/10 cepas), *icaB* (1/10 cepas), *icaD* (6/10 cepas). Otras adhesinas detectadas fueron los genes asociados al factor clumping *clfA* (4/10 cepas) y el gen asociado a la unión al colágeno *cna* (1/10 cepas).

Entre las exoenzimas la superóxido dismutasa *sodA* se encontró con mayor frecuencia (6/10 cepas) en comparación con la Leucocidina de Pantón Valentine (*pvl*) (3/10 cepas). Los factores de virulencia encontrados con menos frecuencia fueron los capsulares *cap5* (2/10 cepas), *cap8* (1/10 cepas) (Tabla 9).

Tabla 9. Presencia de genes que codifican para diferentes factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus* spp.

Cepa	Genes vinculados a proteínas de superficie						Genes para antígenos capsulares			Genes de exoenzimas		Total genes por cepa
	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaD</i>	<i>clfA</i>	<i>cna</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>sodA</i>	<i>pvl</i>	
Cepa 2 (<i>S. aureus</i>)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	7
Cepa 18 (<i>S. aureus</i>)	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	7
Cepa 12 (<i>S. aureus</i>)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	6
Cepa 17 (<i>S. aureus</i>)	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	5
Cepa 5 (<i>S. aureus</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
Cepa 7 (<i>S. epidermidis</i>)	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	5
Cepa 9 (<i>S. epidermidis</i>)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	4
Cepa 15 (<i>S. epidermidis</i>)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4
Cepa 20 (<i>S. epidermidis</i>)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	4
Cepa 8 (<i>S. epidermidis</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Total	9	7	3	1	6	5	1	2	1	6	3	

Al relacionar la cantidad de factores de virulencia, la resistencia antimicrobiana en bacterias planctónicas y biofilms observamos que hay una tendencia de los *S. aureus* a poseer un mayor número de factores de virulencia (entre 5 y 7), y una alta resistencia a antimicrobianos de las bacterias planctónicas comparado con los *S. epidermidis*. En cuanto a la formación de biofilms nuevamente observamos una biomasa mayor en los *S. aureus* respecto a los *S. epidermidis*. Del efecto de los antimicrobianos en la formación del biofilms observamos que tanto clindamicina como gentamicina no producen un efecto significativo sobre el mismo, salvo en el caso de concentraciones > a 32 µg/ml de gentamicina. Por otro lado, con ciprofloxacina y vancomicina si se observa una reducción significativa del biofilm.

Dentro del grupo de cepas de *S. aureus* observamos 1 caso (cepa 5) que solo se detectó la presencia de *icaB* en los factores de virulencia, pero su capacidad de formar biofilms fue sumamente elevada. En el grupo de los *S. epidermidis*, todos mostraron menor cantidad de factores de virulencia, menor resistencia y fuerte formación de biofilms. La cepa 9 de *S. epidermidis* fue la única que mostró una moderada capacidad de formar biofilms, pero nuevamente observamos la presencia de genes *icaD* en este caso.

6. Discusión

El presente trabajo analizó por primera vez los agentes etiológicos responsables de las infecciones de prótesis de cadera y su vinculación con la formación de biofilms, como posibles determinantes de la remoción de prótesis en Uruguay. Más de la mitad (66%) de las prótesis de cadera analizadas, removidas en el Banco de Prótesis por sospecha de infección, en el período comprendido entre 2019-2021, presentaron biofilms asociados a la superficie utilizando tinción con cristal violeta. Según la Organización Mundial de la salud en el año 2002, más de la mitad de las infecciones que afectan a pacientes ligeramente inmunocomprometidos son producidas por bacterias que generalmente integran su microbiota cutánea, capaces de producir infecciones de tipo crónico y que responden pobremente a tratamientos antibióticos y no son prevenibles mediante inmunización. Encontramos aquí, entre otras, a las infecciones vinculadas a prótesis de cadera (Lasa et al., 2005). El análisis directo de los implantes y tejidos de estas

infecciones, muestra claramente que en la mayoría de los casos las bacterias responsables de la infección crecen adheridas sobre el tejido o el implante, formando comunidades de bacterias, los biofilms (Lasa et al., 2005).

El método de recuperación bacteriana ocupa un lugar muy importante para el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes. En este estudio utilizamos el sonicado (método mecánico) para el desprendimiento del biofilm como una alternativa a las metodologías tradicionales de recuperación bacteriana. Mediante la utilización de esta metodología obtuvimos una recuperación bacteriana del 71.4 %. Según Beam & Osmon (2018), este método permite desprender de forma eficiente el biofilm, lo cual aumenta la posibilidad de identificar los patógenos. Estudios como el de Holinka (2011) y el Trampuz (2007) aseguran que el sonicado como método de recuperación bacteriana es más sensible que la utilización de cultivo bacteriano directo. Aseguran incluso que su sensibilidad aumenta aún más en poblaciones de pacientes con tratamiento antibiótico de al menos 15 días. Sin embargo, la utilización del sonicado como método de recuperación bacteriana es discutido por algunos autores con opiniones muy diversas. En el caso de Dudareva et al. (2018), si bien expone la metodología del sonicado como una alternativa simple, el resultado microbiológico lo describe como muy variable. Además de que existe una limitante en la utilización del sonicado, y es que esta técnica requiere de un equipamiento específico que no está disponible en todos los laboratorios de microbiología clínica. Por otra parte se observó que el DTT, el β -mercaptoetanol y la cisteína causan inhibición significativa de la formación de biofilms en *S. aureus* (Suresh et al., 2019). Por lo tanto, utilizar el DTT como método de recuperación bacteriana tal vez no sea la mejor opción.

La identificación bacteriana en este trabajo se realizó utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF y permitió la identificación de 16 microorganismos provenientes de las 15 prótesis removidas quirúrgicamente con un score clase A. La introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF, en el laboratorio de microbiología supone un cambio radical en la precisión de la identificación y el tiempo de respuesta (6 minutos por bacteria), comparándolo con la identificación convencional que tarda al menos 16 horas desde un cultivo positivo, además de la reducción del costo en unas 5 veces (P. García et al., 2012). Algo con lo que varios autores coinciden es que es un método preciso, que permite la identificación de bacterias directamente de las muestras clínicas, así como la detección de algunos de los mecanismos de resistencia bacterianos. Es también un método

rápido y rentable en comparación con las técnicas de microbiología básicas e incluso con técnicas de biología molecular (Carbonnelle & Raskine, 2011). Incluso desde el estudio de Lallemand et al (2017), donde evalúa las ventajas del MALDI-TOF para el diagnóstico de infecciones óseas y articulares tras enriquecimiento o muestras osteoarticulares, aseguran que se puede identificar correctamente las bacterias a nivel de especie y género. La desventaja es la posibilidad de contar con este equipo, no siempre disponible en laboratorios de microbiología clínica.

La mayoría de los microorganismos recuperados (75%) pertenecen al género *Staphylococcus* spp., donde se destacaron las especies de *S aureus* (37.5%) y en igual proporción *S. epidermidis*. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores a nivel internacional siendo el género *Staphylococcus* spp. el más frecuente encontrado en este tipo de infecciones. (Aggarwal et al., 2014; Alonzo III & Torres, 2014; Beenken et al., 2004; Hennig et al., 2007; Houston et al., 2011; McCarthy & Lindsay, 2010; Ní Eidhin et al., 1998; O’GARA & Humphreys, 2001; Planet et al., 2019; Ramirez-Sanchez et al., 2021; Tande & Patel, 2014).

S. aureus es una de las especies mayormente reconocidas como responsables de este tipo de infecciones incluidas las cepas meticilino sensibles (SAMS) y las cepas meticilino resistentes (SAMR) (Pozzi et al., 2012; Ricciardi et al., 2018). Tanto SAMS como SAMR pueden ser adquiridas a nivel hospitalario como comunitario (Aguayo-Reyes et al., 2018; A. García et al., 2019; Lamret et al., 2020; Otero et al., 2013). Su elevado potencial de infección metastásica, su gran afinidad por el material extraño y su gran capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos le permite adaptarse y resistir los tratamientos (Dufour et al., 2019; Foster, 2017). La prevalencia de *S. aureus* también puede explicarse por la colonización de la piel y los tejidos blandos, que conduce a la infección a través de las heridas y la vía hematógena ya que este microorganismo integra la microbiota human cutánea (Rakow et al., 2019; Romero-González, 2020).

S. epidermidis es otra de las especies con alta prevalencia en este tipo de infecciones coloniza la piel y las mucosas humanas, pero no se conocen con precisión los mecanismos y factores responsables de su transformación de integrante de la microbiota en patógeno. Es uno de los causantes más frecuente de sepsis a nivel hospitalario y de infecciones de dispositivos médicos implantados, posee una marcada resistencia a los antibióticos y representa un grave problema, ya que un elevado porcentaje de las cepas son multirresistentes (Raad et al., 1998). La formación de biofilms se considera uno de

los principales factores de virulencia (Frebourg et al., 2000) ya que las infecciones más importantes causadas por este microorganismo son las vinculadas a dispositivos médicos.

Cabe destacar que en nuestro trabajo no se detectó la presencia de *S. haemolyticus*, habitante importante de la microbiota cutánea humana, su presencia está muy extendida en los hospitales y entre el personal sanitario muy vinculado también en infecciones vinculadas a dispositivos médicos (Heilmann et al., 2019). Es un microorganismo emergente causante de infecciones nosocomiales graves, como es el caso de meningitis, endocarditis, infecciones de prótesis articulares, bacteriemia, septicemia, peritonitis y otitis, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (Heilmann et al., 2019). Además *S. haemolyticus* es en general más resistente a los antibióticos que otros *Staphylococcus* coagulasa negativos (Eltwisy et al., 2022). Posee gran capacidad de formar biofilms y secretar factores de adhesión e invasión bacteriana como lo son las enterotoxinas, hemolisinas y proteínas de unión a fibronectina (Eltwisy et al., 2022).

Los *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Cutibacterium acnes* son otros agentes implicadas comúnmente en las infecciones de prótesis articulares (Lamret et al., 2020). En este trabajo *C. xerosis* fue recuperada en dos prótesis estudiadas. Este microorganismo ha sido reportado en la literatura como patógeno asociado a infecciones de prótesis de cadera, capaz de generar biofilms y provocar la remoción de estos dispositivos (Drago et al., 2019; Kalt et al., 2018). A su vez, en infecciones vinculadas a la formación de biofilms, *Corynebacterium* aparece como uno de los principales patógenos relevantes junto con, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Mottola et al., 2016). *Klebsiella pneumoniae* es otro de los agentes etiológicos identificados en este trabajo y su relevancia en la formación de biofilms sobre dispositivos médicos también ha sido reportado en la literatura (Wang et al., 2020).

Nuevas investigaciones han reportado que la presencia de asociaciones de patógenos co-infectando, como es el caso de cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, son capaces de formar biofilms con mayor resistencia a los tratamientos antibióticos (Serra et al., 2015). En nuestro estudio detectamos la presencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa* co-infectando en una de las prótesis analizadas. Estos hallazgos son relevantes en el contexto epidemiológico local, ya que demuestran la necesidad de monitorear qué microorganismo causan estas infecciones en nuestro país y así desarrollar pautas nacionales de tratamiento empírico de estas infecciones. Estas acciones permitirían mejorar las políticas públicas para combatir la resistencia bacteriana. Asimismo, estos hallazgos, aunque en menor

escala nos permiten extrapolar resultados, y analizar que nuestros resultados se encuentran dentro de los resultados a nivel internacional. Con tendencias que se asemejan a lo reportado por otros autores.

Todos los microorganismos identificados, excepto uno de los que fueron analizados, presentaron fuerte capacidad de generar biofilms *in vitro* utilizando el criterio de Villegas et al (2013). En general tanto *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* son descritos en la bibliografía como fuertes formadores de biofilms (Drago et al., 2019; Mottola et al., 2016; Wang et al., 2020).

El ensayo de inhibición de formación de biofilm mostró resultados variables según el antibiótico y las dosis utilizadas. La gentamicina no fue capaz de inhibir la formación de biofilm en cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes, sin embargo, a concentraciones de 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$ fue capaz de lograr una disminución significativa de la formación de biofilms en cepas sensibles. Según Paduszynska et al (2020), el porcentaje de actividad metabólica en biofilms tratados con gentamicina se redujo en 40% a concentraciones mayores a 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo en el trabajo de Hess et al (2011) concluyen que la gentamicina no mata eficazmente a *S. aureus* dentro de los biofilms, especialmente en infecciones asociadas a suturas, a su vez aseguran que la gentamicina también favorece el aumento de la biomasa de los biofilms de *S. aureus*. Hoffman et al (2005) demostraron que las concentraciones subinhibitorias de antibióticos aminoglucósidos inducen la formación de biofilms en *P. aeruginosa*, la regulación de la resistencia se da a través de un segundo mensajero bacteriano vinculado a la adhesión de la superficie celular. Los resultados en este trabajo demuestran que la formación de biofilms puede ser una reacción específica y defensiva a la presencia del antibiótico (Hoffman et al., 2005). (Kumar et al., 2008; Yoshizawa et al., 1998). Todo esto podría estar explicando porque en nuestro trabajo la gentamicina no logró inhibir la formación del biofilm.

La ciprofloxacina es uno de los antibióticos utilizados con buenos resultados tras el desbridamiento y la retención del implante en infecciones de prótesis articulares agudas con regímenes orales de tratamiento (Le Vavasseur & Zeller, 2022). En nuestro trabajo el tratamiento con ciprofloxacina disminuyó de forma significativa la formación de biofilms en las concentraciones de 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ en cepas resistentes, mientras que fue capaz de disminuir de forma significativa la formación de biofilms en todas las concentraciones testeadas en cepas sensibles. Por otro lado, Obinaju et al (2021) mostraron que a concentraciones mínimas inhibitorias de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacina fue

efectiva en la inhibición de la formación de biofilms. Sin embargo para Yasir et al (2021), la ciprofloxacina no fue capaz de inhibir la formación de biofilm por la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* a una concentración de 0.5 µg /ml. La ciprofloxacina que es una fluoroquinolona y su mecanismo de acción consiste en la inhibición selectiva de la ADN girasa bacteriana (enzima esencial para el mantenimiento de la topología del ADN bacteriano) que le da un gran poder destructivo sobre la bacteria en crecimiento y sobre el biofilm. Este grupo antibiótico tiene una acción bactericida rápida (que es dosis dependiente en relación a la concentración antibiótica) (Campoli-Richards et al., 1988).

Otro de los antibióticos utilizados habitualmente es la clindamicina, sin embargo, en este trabajo encontramos que dicho antibiótico no fue efectivo en inhibir la formación de biofilms en ninguna de las concentraciones testeadas tanto de cepas resistentes como sensibles. Esto es concordante con el trabajo de Smith et al (2009), en el que evidencian un escaso efecto de la clindamicina sobre el biofilm, con un alto porcentaje de bacterias (incluso sensibles a la clindamicina) que sobrevivían en el biofilm luego de la exposición a éste antibiótico. .

El antibiótico que mejor inhibió el desarrollo de biofilms y de células planctónicas fue la vancomicina, ya que todas las cepas analizadas fueron sensibles a dicho antibiótico. Resultado que puede explicarse debido a que nuestro país según datos actuales, no hay reportadas hasta el momento en Uruguay de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (SARV). Existe una alerta epidemiológica de vigilancia de *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) en América Latina, la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) recomienda a los estados miembros monitorear la presencia de determinados patógenos de relevancia en la salud pública (OPS, 2013). En nuestro país contamos desde 1996 con un centro de vigilancia de infecciones intrahospitalarias, dependiente de la División de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (Alonso et al., 2018). El primer caso de SARV en América Latina fue detectado en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de Clínicas de Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, el primer hallazgo de SARV en Brasil en el año 2012 (OPS, 2013). Así mismo existen trabajos como el de Smith (2009) donde demuestra que en una población de células que es sometida a distintos antibióticos el porcentaje de células que sobrevive en el biofilm tras el agregado de vancomicina disminuye significativamente y es mayor que el observado frente a otros antibióticos de uso habitual.

Un problema importante que se presenta a la hora de tratar infecciones por *S. aureus* es el rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos. En infecciones con biofilms esto puede verse agravado por un aumento de la CIM de los antibióticos en comparación con las bacterias planctónicas (Bjarnsholt et al., 2013). Si bien la vancomicina es el fármaco que se administra con mayor frecuencia en las infecciones asociadas a biofilms por *S. aureus*, los médicos son cautelosos a la hora de administrar este fármaco debido a la predisposición de *S. aureus* en desarrollar resistencia (Bhattacharya et al., 2015). La tolerancia de vancomicina para cepas planctónicas es de 2µg/ml, mientras que para biofilms es de 20µg/ml y requiere muchas veces el uso combinado con otros fármacos como la rifampicina (Bhattacharya et al., 2015; Ciofu et al., 2017).

Este trabajo apoya la hipótesis de que los biofilms serían los responsables del fracaso terapéutico en pacientes con sospecha de infección en implantes articulares de cadera desde el punto de vista microbiológico. Además, apoya la idea de que asumir que los patógenos actúan como microorganismos independientes y no como biofilms a la hora de plantear el tratamiento antibiótico, reduciría la efectividad del mismo (Høiby et al., 2010; March Roselló & Eiros Bouza, 2013; Zimmerli et al., 2004). Existen estudios donde analizan la capacidad inhibitoria de determinados antimicrobianos, distintos a los utilizados en este trabajo, sobre el biofilm dependiendo de su estado (joven o maduro) (Anwar et al., 1992; Høiby et al., 2015). Estos estudios muestran mayor poder inhibitorio en biofilms más jóvenes casi como si fueran células planctónicas (Amorena et al., 1999; Anwar et al., 1992). Incluso en el trabajo de Bjarnsholt et al (2013), señala que la diferencia de sensibilidad antibiótica *in vitro*, es mucho mayor en el primer día de formación del biofilm comparada con la sensibilidad que hay entre el día 3 y 5. Si bien en nuestro estudio los ensayos se realizaron sobre el biofilm en formación (jóvenes), pudimos ver que no todos los antibióticos tienen poder inhibitorio sobre su formación, incluso para aquellas cepas con sensibilidad a los mismos en estado planctónico. Por lo tanto, comprender los mecanismos que subyacen a la resistencia y tolerancia a los antibióticos, ayudaría a desarrollar tratamientos que alteren este mecanismo de defensa y que la terapia antimicrobiana sea más efectiva (Hall & Mah, 2017).

La evidencia disponible sugiere algunos mecanismos que tienen que ver con la alta frecuencia de mutación en el interior del biofilm, con la incapacidad de penetración del antibiótico debido a alteraciones químicas del microambiente del biofilm que

interfieren con el antibiótico y con cambios fenotípicos de las bacterias que componen el biofilm (Høiby et al., 2010). Las mutaciones por sí solas incrementan la probabilidad de transmisión horizontal de genes de resistencia (Driffield et al., 2008; Høiby et al., 2010; Roy et al., 2018). A su vez la frecuencia de mutación que poseen las bacterias que crecen en los biofilms es significativamente mayor que la frecuencia de mutación de las bacterias isogénicas que crecen en estado planctónico (Høiby et al., 2015). Esta condición fisiológica podría explicar la multiresistencia que adquieren las bacterias planctónicas encontradas en los biofilms a fármacos tradicionales como β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Høiby et al., 2010).

La sobreexpresión de bombas de eflujo bajo el estilo de vida de los biofilms, provocando un aumento de la resistencia a los antibióticos también podría estar explicando la multiresistencia (Alav et al., 2018; Hassanzadeh et al., 2020). Deberíamos también considerar la presión selectiva que ejerce el uso prolongado de los antibióticos, así como también las condiciones inmunológicas del hospedero.

Los *Staphylococcus* spp., son patógenos oportunistas que han desarrollado una compleja red reguladora para controlar su virulencia. Una de sus principales funciones es detectar diversas señales ambientales y responder alterando la producción de factores de virulencia necesarios para la supervivencia en el hospedero, incluidas las adhesinas de la superficie celular y las enzimas y toxinas extracelulares (Jenul & Horswill, 2018). En este trabajo los *Staphylococcus* spp. aislados, presentaron genes que codifican para factores de virulencia asociados a la formación de biofilms. El 90% de las muestras de *Staphylococcus* spp., presentaron los genes asociados a fibronectina (*fnbPs*). Casillas- Ituarte et al (2012) proponen en su trabajo que solo los factores asociados con la presencia de factores de unión a la fibronectina parecieran ser los más relevantes en la formación de biofilms. Según Trampuz et al (2005) la adherencia de *S. aureus* estaría vinculada con la presencia de fibronectina, mientras que en *S. epidermidis* la adherencia estaría vinculada a la adhesina intracelular polisacáridica (PIA) codificada por el operón *ica*. Este hallazgo no se ve reflejado en los resultados obtenidos en nuestro trabajo ya que la proporción de genes vinculados a la fibronectina fue similar en *S. aureus* y *S. epidermidis*.

En *S. aureus* y en *S. epidermidis* el operón *ica*, codifica las enzimas responsables de la formación de la adhesina intracelular polisacáridica (PIA) o el poli-N-acetilglucosamina (PNGA) que participan en la formación del biofilm (O’Gara, 2007). PIA funciona como una adhesina intercelular que atrae electrostáticamente el

ácido teicoico cargado negativamente a la superficie de la célula bacteriana (Heilmann et al., 2019). En *S. epidermidis* la formación de biofilms se considera uno de los principales factores de virulencia (Frebourg et al., 2000) ya que las infecciones más importantes causadas por este microorganismo son las vinculadas a dispositivos médicos.

El operón *icaADBC* y el gen *icaR*, están implicados en la producción y regulación de PIA y son funcionalmente necesarios para la adhesión célula a célula y para la formación del biofilm (Cafiso et al., 2004). Está presente en los aislados causantes de sepsis, pero no así en los aislados saprofiticos (De Silva et al., 2002; Frebourg et al., 2000; Hennig et al., 2007).

A pesar de la real importancia del locus *icaADBC* y de las vías reguladoras que controlan la producción de PIA/PNAG en el desarrollo de los biofilms de *Staphylococcus*, existen estudios que han empezado a destacar la existencia de mecanismos de biofilms independientes de PIA/PNAG tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* (Pozzi et al., 2012; Rohde et al., 2005).

En el presente trabajo, a 3 cepas de *S. epidermidis* no se le detectaron ninguno de los genes *ica* estudiados, lo que posiblemente esté indicando la existencia de estos mecanismos *ica*-independiente en nuestra colección de aislamientos. Existe una gran diversidad de adhesinas de la superficie celular de *S. aureus* que utiliza para unirse a la matriz extracelular del hospedero por lo que no sorprende la existencia de otros mecanismos (Cafiso et al., 2004).

La cantidad de biomasa del biofilms, también se ve influida por el cambio de las condiciones ambientales, ya que se sabe que estímulos como las concentraciones subinhibitorias de antibióticos, así como las altas temperaturas, la anaerobiosis, el estrés por etanol y la osmolaridad, aumentan la transcripción de *ica* y la formación de biofilms (Conlon et al., 2002; Rachid et al., 2000).

Rachid et al (2000) demostró que la formación de biofilms de *S. epidermidis* es inducida por estrés externo (alta temperatura y osmolaridad). Observaron que las concentraciones subinhibitorias de tetraciclina y del antibiótico semisintético de estreptogramina quinupristina-dalfopristina aumentaban la expresión de *ica* entre 9 y 11 veces. Sin embargo, observaron también que la penicilina, la oxacilina, el cloranfenicol, la clindamicina, la gentamicina, la ciprofloxacina, la vancomicina y la teicoplanina no tenían ningún efecto sobre la expresión de *ica*.

S. aureus utiliza proteínas de superficie, como los factores de agregación de clumping *clfA* y *clfB*, para interactuar con el fibrinógeno, uniendo las células para sobrevivir en el hospedero (Jenul & Horswill, 2018). Según los datos obtenidos en este trabajo el 80% de las cepas de *S. aureus* presentaron el gen que codifica para el factor de virulencia *clfA*. Mientras que en las cepas de *S. epidermidis* solo se observó su presencia en un 20%.

Una estrategia para resistir la muerte oxidativa por fagocitos está mediada por la producción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que utilizan el manganeso como cofactor (Handke et al., 2018; McGuinness et al., 2016). El manganeso desempeña un papel fundamental en esta resistencia mediante la desintoxicación directa de los radicales superóxido, actuando como cofactor de dos superóxido dismutasas (SOD), *SodA* y *SodM* (García et al., 2017; Handke et al., 2018). En cuanto a la presencia del factor de virulencia *SodA* encontramos que estuvo presente en el 60% de las cepas y que su aparición está vinculada a las cepas de *S. epidermidis*.

Dentro de los factores de virulencia que le permiten a *S. aureus* adaptarse fácilmente a diferentes nichos ambientales en diversos hospederos se encuentra el clúster del gen *cap*, que está presente en casi todos los aislados clínicos relevantes de *S. aureus*. La expresión del polisacárido capsular está presente en los aislamientos de pacientes con infección aguda. Sin embargo, el número de aislamientos de *S. aureus* derivados de pacientes con infecciones crónicas que no expresan el polisacárido capsular es significativamente alto. Esto podría indicar que la pérdida de expresión del polisacárido capsular puede ser una característica clave de *S. aureus* asociada a la persistencia (Tuchscher et al., 2010). En nuestro trabajo los factores de virulencia capsulares fueron los que se detectaron en menor frecuencia, en 3 cepas se detectó la presencia del gen *cap*. La presencia de estos genes de virulencia no se reportó de forma simultánea en ninguna de las muestras analizadas. *S. aureus* estuvo vinculado a la presencia del gen *cap5* (en 2 cepas), mientras que en *S. epidermidis* se detectó la presencia del gen *cap8* (en 1 cepa).

Las cepas de SAMR suelen producir leucocidina Pantón-Valentine (*pvl*) (Moroney et al., 2007; Ouchenane et al., 2011; Ramdani-Bougoussa et al., 2006). Esta exotoxina formadora de poros está codificada por dos genes co-transcritos, *lukS* y *lukF-PV*, transportados en un profago integrado en el cromosoma de *S. aureus* (Denis et al., 2005). La expresión de toxina citolítica *pvl* formadora de poros se dirige a las células mononucleares y polimorfonucleares causando la muerte celular por necrosis o apoptosis,

y se ha asociado fuertemente con las cepas de SAMS comunitario (Boyle-Vavra & Daum, 2007). En nuestro trabajo se detectó únicamente *pvl* en 3 de los aislamientos analizados de los cuales 2 eran *S. aureus* metilino sensible y uno presentaba además resistencia inducida por clindamicina.

Debido a la naturaleza multifactorial de las infecciones estafilocócicas y a la redundancia funcional de las adhesinas y exoproteínas de *S. aureus*, es aún difícil determinar el papel que desempeñan los determinantes de virulencia individuales en el proceso patogénico y el rol específico que cumplen sobre la formación del biofilm (O’Riordan & Lee, 2004).

7. Conclusiones

1. El 66% de las prótesis de cadera removidas en el Banco de prótesis de Uruguay en el período comprendido entre 2019-2021, presentaron biofilms asociados a la superficie.
2. El sonicado como método de recuperación bacteriana permitió el aislamiento de microorganismos en un 71.4% (15/21) de las prótesis de cadera analizadas.
3. Las condiciones óptimas para la formación de biofilm *in vitro* fueron utilizando TSB + Glucosa 1% en un tiempo final de incubación de 24 horas.
4. Los microorganismos adheridos a las prótesis articulares poseen fuerte capacidad formadora de biofilms.
5. Los agentes etiológicos detectados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* y *S. epidermidis*.
6. La sensibilidad antibiótica de los aislamientos de *Staphylococcus* spp., presentó gran diversidad de fenotipos de resistencia, la mayoría de las cepas (70%) fueron resistentes a gentamicina y la menor resistencia se encontró con clindamicina (30%). Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina y el 70% lo fue a meticilina.
7. La eficacia de los antibióticos en la inhibición en la formación de biofilms *in vitro* varió de acuerdo con el tipo de antibiótico y la concentración testada. Vancomicina fue el antibiótico con mayor capacidad de inhibir de forma significativa la formación de biofilm *in vitro*, ciprofloxacina también logró

buenos resultados, mientras que gentamicina solo logró inhibir de forma significativa la formación de biofilms a las concentraciones mas altas analizadas. Por otra parte, clindamicina no mostró capacidad de inhibir de forma significativa la formación de biofilm *in vitro*.

8. Los factores de unión a la fibronectina A y B fueron los factores de virulencia más frecuentemente encontrados (90%), seguidos por la presencia de los genes que codifican para *icaABCD* en un 70% de las muestras clínicas de *Staphylococcus* spp.

8. Perspectivas

- Con el fin de describir mejor la epidemiología nacional de los agentes etiológicos de infecciones de prótesis, sería importante continuar el monitoreo e incluir muestras de otros prestadores de salud de Uruguay.
- Realizar estudios que evalúen y comparen diferentes métodos para el desprendimiento de biofilms de las prótesis articulares de cadera.
- Realizar estudios de metagenómica. Complementa identificación de los agentes etiológicos, podría comparar los métodos de desprendimiento y también provee de información sobre genes presentes en estos microorganismos.
- Podría utilizarse gel por campo pulsante con enzimas de restricción poco frecuentes para evaluar a nivel epidemiológico la presencia de una o varias clonas en las cepas analizadas.
- En este estudio evaluamos la inhibición de la formación de biofilms aplicando los antibióticos a tiempo cero junto con las bacterias. Sería interesante evaluar también la actividad de estos antibióticos sobre el biofilm ya formado. Y sumar el testeo de otros antibióticos utilizados para el tratamiento de estas infecciones como es el caso de la rifampicina.
- Trabajar en la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos, inmunoterapia, péptidos antimicrobianos, nanopartículas, generación de proteínas recombinantes y tratamientos con bacteriófagos para poder analizar el impacto en los biofilms.
- Complementar los resultados microbiológicos de la investigación, evaluando de forma conjunta con el equipo de médicos tratantes tanto los antecedentes como la evolución clínica de los pacientes.

9. Bibliografía

- Abonnenc, M., Qiao, L., Liu, B., & Girault, H. H. (2010). Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 3, 231-254. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.111808.073740>
- Aggarwal, V. K., Bakhshi, H., Ecker, N. U., Parvizi, J., Gehrke, T., & Kendoff, D. (2014). Organism profile in periprosthetic joint infection: Pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *The journal of knee surgery*, 27(05), 399-406.
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., & González-Rocha, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista chilena de infectología*, 35(1), 7-14.
- Akanda, Z. Z., Taha, M., & Abdelbary, H. (2018). Current review—The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. *Journal of Orthopaedic Research®*, 36(4), 1051-1060.
- Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003-2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Albornoz, H., Baldizzoni, M., Gambogi, R., González, M. del C., Scarpita, C., Ketzoian, C., Gómez, J. C., Perna, A., & Cabrera, M. (2009). Artroplastia de Cadera y Rodilla. *Técnica. Programa de Seguimiento del Fondo Nacional de Recursos*, 9.
- Alonso, L., Gagliano, G., González, A., Grill, F., Nabón, A., & Seija, V. (2018). *Plan Nacional de Acción contra la Resistencia Antimicrobiana. Abordaje desde la Salud Pública*. Ministerio de Salud Pública, Uruguay.
- Alonzo III, F., & Torres, V. J. (2014). The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 199-230.
- Ambroggio, M. B., Perrig, M. S., Camussone, C., Pujato, N., Bertón, A., Giannechini, E., Alvarez, S., Marcipar, I. S., Calvino, L. F., & Barbagelata, M. S. (2018). Survey of potential factors involved in the low frequency of CP5 and CP8 expression in *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis of dairy cattle from Argentina, Chile, and Uruguay. *Journal of Applied Genetics*, 59(3), 357-363. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0443-8>
- Amorena, B., Gracia, E., Monzón, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pérez, M., Alabart, J.-L., & Hernández-Yago, J. (1999). Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(1), 43-55.
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(7), 1818-1824.

- Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., Becerra, M., Padola, N., & Paraje, M. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The scientific world journal*, 2013.
- Anwar, H., Strap, J. L., & Costerton, J. W. (1992). Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36(7), 1347-1351.
- Arciola, C. R., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2151-2156.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2005). Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS microbiology letters*, 246(1), 81-86.
- Ariza, J., Euba, G., & Murillo, O. (2008). Orthopedic device-related infections. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 26(6), 380-390.
- Artini, M., Scoarughi, G. L., Papa, R., Cellini, A., Carpentieri, A., Pucci, P., Amoresano, A., Gazzola, S., Cocconcilli, P. S., & Selan, L. (2011). A new anti-infective strategy to reduce adhesion-mediated virulence in *Staphylococcus aureus* affecting surface proteins. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24(3), 661-672. <https://doi.org/10.1177/039463201102400312>
- Bagge, N., Ciofu, O., Skovgaard, L. T., & HØlby, N. (2000). Rapid development in vitro and in vivo of resistance to ceftazidime in biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa* due to chromosomal β -lactamase. *Apmis*, 108(9), 589-600.
- Baig, S., Johannesen, T. B., Overballe-Petersen, S., Larsen, J., Larsen, A. R., & Stegger, M. (2018). Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 74-76.
- Beam, E., & Osmon, D. (2018). Prosthetic Joint Infection Update. *Infectious Disease Clinics of North America*, 32(4), 843-859. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.06.005>
- Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Blevins, J. S., & Smeltzer, M. S. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of bacteriology*, 186(14), 4665-4684.
- Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2015). Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(12), 1499-1516. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1100533>
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., & Prod'Hom, G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), 1549-1554.

- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., & Høiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development—Can a new approach be developed? *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(10), 791-808.
- Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., & Matic, I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science*, *300*(5624), 1404-1409.
- Boles, B. R., & Singh, P. K. (2008). Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(34), 12503-12508.
- Boswihi, S. S., & Udo, E. E. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Current Medicine Research and Practice*, *8*(1), 18-24.
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, *87*(1), 3-9.
- Brickner, S. J., Barbachyn, M. R., Hutchinson, D. K., & Manninen, P. R. (2008). Linezolid (ZYVOX), the first member of a completely new class of antibacterial agents for treatment of serious gram-positive infections. *Journal of medicinal chemistry*, *51*(7), 1981-1990.
- Bukowski, M., Wladyka, B., & Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, *2*(5), 1148-1165.
- Bulloch, M. N., Baccas, J. T., & Arnold, S. (2016). Clindamycin-induced hypersensitivity reaction. *Infection*, *44*(3), 357-359. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0826-2>
- Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Campanile, F., Amicosante, G., Perilli, M. G., Selan, L., Artini, M., Nicoletti, G., & Stefani, S. (2004). Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*(12), 1081-1088.
- Campoli-Richards, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., & Ward, A. (1988). Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, *35*(4), 373-447. <https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003>
- Carbonnelle, E., & Raskine, L. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Bio tribune magazine*, *39*, 35-42.
- Cárdenas-Perea, M. E., Cruz y López, O. R., Gándara- Ramírez, J. L., & Pérez-Hernández, M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: La “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, *94*, 35-43.
- Casillas-Ituarte, N. N., Lower, B. H., Lamlerthton, S., Fowler, V. G., & Lower, S. K. (2012). Dissociation rate constants of human fibronectin binding to fibronectin-binding

proteins on living *Staphylococcus aureus* isolated from clinical patients. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6693-6701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.285692>

Center of Disease Control and Prevention - CDC. (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Atlanta, GA.: US Department of Health and Human Services, Center of Disease Control and Prevention.

Cerca, N., Jefferson, K. K., Maira-Litrán, T., Pier, D. B., Kelly-Quintos, C., Goldmann, D. A., Azeredo, J., & Pier, G. B. (2007). Molecular Basis for Preferential Protective Efficacy of Antibodies Directed to the Poorly Acetylated Form of Staphylococcal Poly-N-Acetyl- β -(1-6)-Glucosamine. *Infection and Immunity*, 75(7), 3406-3413. <https://doi.org/10.1128/iai.00078-07>

Cercenado, E. (2017). Utility of rapid microbiological techniques for the diagnosis of severe infections. *Rev Esp Quimioter*, 30(Suppl 1), 52-55.

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.

Ciofu, O., Rojo-Molinero, E., Macià, M. D., & Oliver, A. (2017). Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 125(4), 304-319. <https://doi.org/10.1111/apm.12673>

CLSI. (2021). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 31st ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-104-8 [Print]; ISBN 978-1-68440-105-5 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA.

Conlon, K. M., Humphreys, H., & O’Gara, J. P. (2002). *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*, 184(16), 4400-4408.

Costerton, J. W., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Introduction to microbial biofilms. En *Microbial biofilms* (pp. 1-11).

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

Crabbé, A., Jensen, P. Ø., Bjarnsholt, T., & Coenye, T. (2019). Antimicrobial Tolerance and Metabolic Adaptations in Microbial Biofilms. *Trends in Microbiology*, 27(10), 850-863. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.003>

Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., Bridgett, L., Williams, S., Guillemin, F., & Hill, C. L. (2014). The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the global burden of disease 2010 study. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(7), 1323-1330.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183(9), 2888-2896.

Darouiche, R. O. (2001). Device-associated infections: A macroproblem that starts with microadherence. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(9), 1567-1572. <https://doi.org/10.1086/323130>

Darouiche, R. O. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine*, 350(14), 1422-1429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra035415>

Davis, J. S., Metcalf, S., Clark, B., Robinson, J. O., Huggan, P., Luey, C., McBride, S., Aboltins, C., Nelson, R., Campbell, D., Solomon, L. B., Schneider, K., Loewenthal, M. R., Yates, P., Athan, E., Cooper, D., Rad, B., Allworth, T., Reid, A., ... Manning, L. (2022). Predictors of Treatment Success After Periprosthetic Joint Infection: 24-Month Follow up From a Multicenter Prospective Observational Cohort Study of 653 Patients. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(3), ofac048. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac048>

De Silva, G. D. I., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, R. C., Wilkinson, A. R., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2002). The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 382-388.

De Vecchi, E., Bortolin, M., Signori, V., Romanò, C. L., & Drago, L. (2016). Treatment With Dithiothreitol Improves Bacterial Recovery From Tissue Samples in Osteoarticular and Joint Infections. *The Journal of Arthroplasty*, 31(12), 2867-2870. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.05.008>

Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A. S., & Losick, R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 197(24), 3779-3787.

Denis, O., Deplano, A., De Beenhouwer, H., Hallin, M., Huysmans, G., Garrino, M. G., Glupczynski, Y., Malaviolle, X., Vergison, A., & Struelens, M. J. (2005). Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1103-1106.

Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 747-763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>

Drago, L., Clerici, P., Morelli, I., Ashok, J., Benzakour, T., Bozhkova, S., Alizadeh, C., Del Sel, H., Sharma, H. K., & Peel, T. (2019). The world association against infection in orthopaedics and trauma (WAIOT) procedures for microbiological sampling and processing for periprosthetic joint infections (PJIs) and other implant-related infections. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 933.

Drago, L., Signori, V., De Vecchi, E., Vassena, C., Palazzi, E., Cappelletti, L., Romano, D., & Romano, C. L. (2013). Use of dithiothreitol to improve the diagnosis of prosthetic joint infections. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(11), 1694-1699.

- Drifffield, K., Miller, K., Bostock, J. M., O'Neill, A. J., & Chopra, I. (2008). Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(5), 1053-1056. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn044>
- Dudareva, M., Barrett, L., Figtree, M., Scarborough, M., Watanabe, M., Newnham, R., Wallis, R., Oakley, S., Kendrick, B., Stubbs, D., McNally, M. A., Bejon, P., Atkins, B. A., Taylor, A., & Brent, A. J. (2018). Sonication versus Tissue Sampling for Diagnosis of Prosthetic Joint and Other Orthopedic Device-Related Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(12), e00688-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00688-18>
- Dufour, S., Piroth, L., Chirouze, C., Tattevin, P., Becker, A., Braquet, P., Ferry, T., Duval, X., Le Moing, V., & VIRSTA/AEPEI Study Group. (2019). Staphylococcus aureus Bloodstream Infection in Patients With Prosthetic Joints in the Prospective VIRSTA Cohort Study: Frequency and Time of Occurrence of Periprosthetic Joint Infection. *Open Forum Infectious Diseases*, *6*(12), ofz515. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz515>
- Dumitrescu, O., Badiou, C., Bes, M., Reverdy, M.-E., Vandenesch, F., Etienne, J., & Lina, G. (2008). Effect of antibiotics, alone and in combination, on Pantón–Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(4), 384-388.
- Dunne Jr, W. M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, *15*(2), 155-166.
- Edwards, A. M., Massey, R. C., & Clarke, S. R. (2012). Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Molecular oral microbiology*, *27*(1), 1-10.
- Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E., & Massey, R. C. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS pathogens*, *6*(6), e1000964.
- Elder, M. J., Stapleton, F., Evans, E., & Dart, J. K. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*, *9*(1), 102-109.
- Eltwisy, H. O., Twisy, H. O., Hafez, M. H., Sayed, I. M., & El-Mokhtar, M. A. (2022). Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*, *10*(6), 1130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061130>
- Ensing, G. T., Neut, D., Horn, J. R. van, Mei, H. C. van der, & Busscher, H. J. (2006). The combination of ultrasound with antibiotics released from bone cement decreases the viability of planktonic and biofilm bacteria: An in vitro study with clinical strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1287-1290.
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews*, *41*(3), 430-449.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews microbiology*, *12*(1), 49-62.

- Frebourg, N. B., Lefebvre, S., Baert, S., & Lemeland, J.-F. (2000). PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of clinical microbiology*, *38*(2), 877-880.
- García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. del R., & Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México. *Biomédica*, *39*(3), 513-523.
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista chilena de infectología*, *29*(3), 263-272.
- Garcia, Y. M., Barwinska-Sendra, A., Tarrant, E., Skaar, E. P., Waldron, K. J., & Kehl-Fie, T. E. (2017). A superoxide dismutase capable of functioning with iron or manganese promotes the resistance of *Staphylococcus aureus* to calprotectin and nutritional immunity. *PLoS Pathogens*, *13*(1), e1006125.
- Geoghegan, J. A., Corrigan, R. M., Gruszka, D. T., Speziale, P., O’Gara, J. P., Potts, J. R., & Foster, T. J. (2010). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, *192*(21), 5663-5673.
- Gerding, D. N., Hughes, C. E., Bamberger, D. M., Foxworth, J., & Larson, T. A. (1996). Extravascular antimicrobial distribution and the respective blood concentrations in humans. *Antibiotics in laboratory medicine*, *4*, 835-899.
- Gilbert, I. (1931). Dissociation in an encapsulated staphylococcus. *Journal of bacteriology*, *21*(3), 157-160.
- Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 276-301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Hamad, T., Hellmark, B., Nilsson-Augustinsson, Å., & Söderquist, B. (2015). Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections, with focus on doxycycline. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *123*(12), 1055-1060. <https://doi.org/10.1111/apm.12465>
- Handke, L. D., Gribenko, A. V., Timofeyeva, Y., Scully, I. L., & Anderson, A. S. (2018). MntC-Dependent Manganese Transport Is Essential for *Staphylococcus aureus* Oxidative Stress Resistance and Virulence. *mSphere*, *3*(4), e00336-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00336-18>
- Hassanzadeh, S., Ganjloo, S., Pourmand, M. R., Mashhadi, R., & Ghazvini, K. (2020). Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. *Microbial Pathogenesis*, *139*, 103850. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103850>
- Hauck, C. R., & Ohlsen, K. (2006). Sticky connections: Extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*, *9*(1), 5-11.

- Hausner, M., & Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3710-3713.
- Havaei, S. A., Moghadam, S. O., Pourmand, M. R., & Faghri, J. (2010). Prevalence of genes encoding bi-component leukocidins among clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian journal of public health*, 39(1), 8.
- Hebert, C. K., Williams, R. E., Levy, R. S., & Barrack, R. L. (1996). Cost of treating an infected total knee replacement. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 331, 140-145.
- Heilbronner, S., Holden, M. T., van Tonder, A., Geoghegan, J. A., Foster, T. J., Parkhill, J., & Bentley, S. D. (2011). Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS microbiology letters*, 322(1), 60-67.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W., & Becker, K. (2019). Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection*, 25(9), 1071-1080.
- Hennig, S., Wai, S. N., & Ziebuhr, W. (2007). Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(2), 117-122.
- Herbert, S., Barry, P., & Novick, R. P. (2001). Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 69(5), 2996-3003.
- Herrmann, M., Vaudaux, P. E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P. D., Perdreau, F. S., Peters, G., & Waldvogel, F. A. (1988). Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *Journal of Infectious Diseases*, 158(4), 693-701.
- Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., & Wells, C. L. (2011). Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *Journal of Surgical Research*, 170(2), 302-308.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171-1175.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., Williams, C., & ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 Suppl 1, S1-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>

- Holinka, J., Bauer, L., Hirschl, A. M., Graninger, W., Windhager, R., & Presterl, E. (2011). Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(4), 617-622.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Annals of the New York academy of sciences*, 1354(1), 12-31.
- Hooper, D. C., Wolfson, J. S., Ng, E. Y., & Swartz, M. N. (1987). Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *The American journal of medicine*, 82(4A), 12-20.
- Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M., & O’Gara, J. P. (2011). Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infection and immunity*, 79(3), 1153-1165.
- Javouhey, E., Bolze, P.-A., Jamen, C., Lina, G., Badiou, C., Poyart, C., Portefaix, A., Tristan, A., Laurent, F., & Bes, M. (2018). Similarities and differences between staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes in children: Results from a 30-case cohort. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 360.
- Jefferson, K. K., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2005). Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2467-2473.
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology spectrum*, 6(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*, 2019, 2015978. <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>
- Jordana-Lluch, E., Martró Català, E., & Ausina Ruiz, V. (2012). La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(10), 635-644. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.012>
- Kader, A. A., Kumar, A., & Krishna, A. (2005). Induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant, clindamycin susceptible and methicillin-resistant clinical *Staphylococcal* isolates. *Saudi Medical Journal*, 26(12), 1914-1917.
- Kalt, F., Schulthess, B., Sidler, F., Herren, S., Fucentese, S. F., Zingg, P. O., Berli, M., Zinkernagel, A. S., Zbinden, R., & Achermann, Y. (2018). *Corynebacterium* Species Rarely Cause Orthopedic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(12), e01200-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01200-18>
- Kapadia, B. H., Berg, R. A., Daley, J. A., Fritz, J., Bhave, A., & Mont, M. A. (2016). Periprosthetic joint infection. *The Lancet*, 387(10016), 386-394.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs*, 34(9), 737-751.

- Keeshen, T., Case, J. B., Wellehan, J. F., & Dujowich, M. (2017). Bacterial recovery using sonication versus swabbing of titanium and stainless steel implants inoculated with *Staphylococcus pseudintermedius* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: V.C.O.T.*, *30*(5), 346-350. <https://doi.org/10.3415/VCOT-17-02-0031>
- Kumar, C., Himabindu, M., & Jetty, A. (2008). Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: A critical appraisal. *Critical reviews in biotechnology*, *28*(3), 173-212.
- Ladhani, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *39*(2), 181-189.
- Lallemand, E., Arvieux, C., Coiffier, G., Polard, J.-L., Albert, J.-D., Guggenbuhl, P., & Jolivet-Gougeon, A. (2017). Use of MALDI-TOF mass spectrometry after liquid enrichment (BD Bactec™) for rapid diagnosis of bone and joint infections. *Research in microbiology*, *168*(2), 122-129.
- Lamret, F., Colin, M., Mongaret, C., Gangloff, S. C., & Reffuveille, F. (2020). Antibiotic tolerance of *Staphylococcus aureus* biofilm in periprosthetic joint infections and antibiofilm strategies. *Antibiotics*, *9*(9), 547.
- Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, *28*(2), 163-175.
- Le Vavasseur, B., & Zeller, V. (2022). Antibiotic therapy for prosthetic joint infections: An overview. *Antibiotics*, *11*(4), 486.
- Learmonth, I. D., Young, C., & Rorabeck, C. (2007). The operation of the century: Total hip replacement. *Lancet (London, England)*, *370*(9597), 1508-1519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60457-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60457-7)
- Leonard, R. B., & Carroll, K. C. (1997). Rapid lysis of gram-positive cocci for pulsed-field gel electrophoresis using achromopeptidase. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*, *6*(5), 288-291.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.-O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., & Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical infectious diseases*, *29*(5), 1128-1132.
- Long, K. S., & Vester, B. (2012). Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(2), 603-612.
- Low, D. E. (2013). Toxic shock syndrome: Major advances in pathogenesis, but not treatment. *Critical care clinics*, *29*(3), 651-675.
- Ma, D., Mandell, J. B., Donegan, N. P., Cheung, A. L., Ma, W., Rothenberger, S., Shanks, R. M. Q., Richardson, A. R., & Urish, K. L. (2019). The Toxin-Antitoxin MazEF Drives *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation, Antibiotic Tolerance, and Chronic Infection. *mBio*, *10*(6), e01658-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01658-19>
- Machado, V., Pardo, L., Cuello, D., Giudice, G., Luna, P. C., Varela, G., Camou, T., & Schelotto, F. (2020). Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus*

- isolates recovered from food, food establishment surfaces and cases of foodborne diseases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62.
- Mader, J. T., Adams, K., & Morrison, L. (1989). Comparative evaluation of cefazolin and clindamycin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rabbits. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(10), 1760-1764.
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 183-195.
- March Roselló, G. A., & Eiros Bouza, J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Med. clín (Ed. impr.)*, 353-357.
- Mason, W. J., Blevins, J. S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N., & Smeltzer, M. S. (2001). Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3332-3338. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3332-3338.2001>
- McCarthy, A. J., & Lindsay, J. A. (2010). Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: Implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC microbiology*, 10(1), 1-15.
- McGuinness, W. A., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2016). Evasion of neutrophil killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 5(1), 32.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*, 55(1), 165-199.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., & Lodi, R. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. *International Journal of Microbiology*, 2009.
- Moroney, S. M., Heller, L. C., Arbuckle, J., Talavera, M., & Widen, R. H. (2007). Staphylococcal cassette chromosome mec and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 1019-1021.
- Mottola, C., Mendes, J. J., Cristino, J. M., Cavaco-Silva, P., Tavares, L., & Oliveira, M. (2016). Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiologica*, 61(1), 35-43. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0401-3>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(6), 371-382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3324-3334. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>

- Ní Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., & Foster, T. J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, *30*(2), 245-257.
- Nilsson, I. M., Patti, J. M., Bremell, T., Höök, M., & Tarkowski, A. (1998). Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *The Journal of clinical investigation*, *101*(12), 2640-2649.
- Obinaju, N. Q., Ogwunga, C. C., Anyadoh-Nwadike, O. S., & Nwakwasi, U. E. (2021). Effect of Ciprofloxacin on the Growth and Biofilm Formation Ability of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pathogen Research*, *7*(2), 44-59.
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(2), 179-188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- O’GARA, J. P., & Humphreys, H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Importance and implications. *Journal of medical microbiology*, *50*(7), 582-587.
- Ogle, D. H., Doll, J. C., Wheeler, P., & Dinno, A. (2021). *FSA: Fisheries stock analysis. R package version 0.9. 1*. GitHub, Inc USA.
- Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K.-P., Hell, W., Wichelhaus, T. A., & Hacker, J. (1998). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *42*(11), 2817-2823.
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *34*, 877-886.
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., Foster, T. J., & O’Gara, J. P. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of bacteriology*, *190*(11), 3835-3850.
- OPS. (2013). *Staphylococcus aureus resistente a vancomicina*. Alerta epidemiológica. Organización Panamericana de la Salud. 4 pp.
- O’Riordan, K., & Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews*, *17*(1), 218-234.
- Otero, L. H., Rojas-Altuve, A., Llarrull, L. I., Carrasco-López, C., Kumarasiri, M., Lastochkin, E., Fishovitz, J., Dawley, M., Heseck, D., & Lee, M. (2013). How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(42), 16808-16813.
- O’Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *47*, e2437.

- Ouchenane, Z., Smati, F., Rolain, J.-M., & Raoult, D. (2011). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Pathologie-Biologie*, 59(6), e129-132. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.11.004>
- Paduszynska, M. A., Greber, K. E., Paduszynski, W., Sawicki, W., & Kamysz, W. (2020). Activity of temporin A and short lipopeptides combined with gentamicin against biofilm formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 9(9), 566.
- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 529-566.
- Pardo, L., Machado, V., Cuello, D., Aguerrebere, P., Seija, V., Braga, V., & Varela, G. (2020). Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 202-210.
- Pardo, L., Machado, V., Mollerach, M., Mota, M. I., Tuchscher, L. P. N., Gadea, P., Gardella, N., Sordelli, D. O., Vola, M., Schelotto, F., & Varela, G. (2009). Characteristics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Strains Isolated from Skin and Soft-Tissue Infections in Uruguay. *International Journal of Microbiology*, 2009, 472126. <https://doi.org/10.1155/2009/472126>
- Peacock, S. J., Foster, T. J., Cameron, B. J., & Berendt, A. R. (1999). Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*, 145(12), 3477-3486.
- Planet, P. J., Narechania, A., Chen, L., Mathema, B., Boundy, S., Archer, G., & Kreiswirth, B. (2017). Architecture of a Species: Phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 25(2), 153-166. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.009>
- Planet, P. J., Parker, D., Ruff, N. L., & Shinefield, H. R. (2019). Revisiting bacterial interference in the age of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Insights Into *Staphylococcus aureus* carriage, pathogenicity and potential control. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(9), 958-966.
- Portillo, M. E., Salvadó, M., Alier, A., Martínez, S., Sorli, L., Horcajada, J. P., & Puig, L. (2014). Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. *Journal of infection*, 69(1), 35-41.
- Pozzi, C., Waters, E. M., Rudkin, J. K., Schaeffer, C. R., Lohan, A. J., Tong, P., Loftus, B. J., Pier, G. B., Fey, P. D., & Massey, R. C. (2012). Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002626.
- Prinzi, A., & Rhode, R. E. (2023). *The Role of Bacterial Biofilms in Antimicrobial Resistance*. ASM.Org. <https://asm.org:443/Articles/2023/March/The-Role-of-Bacterial-Biofilms-in-Antimicrobial-Re>

- R Development Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing* [Software]. R Foundation for Statistical Computing.
- Raad, I., Alrahwani, A., & Rolston, K. (1998). Staphylococcus epidermidis: Emerging resistance and need for alternative agents. *Reviews of Infectious Diseases*, 26(5), 1182-1187.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., & Ziebuhr, W. (2000). Alternative transcription factor ζ B is involved in regulation of biofilm expression in a Staphylococcus aureus mucosal isolate. *Journal of bacteriology*, 182(23), 6824-6826.
- Rajput, A., Bhamare, K. T., Thakur, A., & Kumar, M. (2022). Biofilm-i: A Platform for Predicting Biofilm Inhibitors Using Quantitative Structure-Relationship (QSAR) Based Regression Models to Curb Antibiotic Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(15), 4861. <https://doi.org/10.3390/molecules27154861>
- Rakow, A., Perka, C., Trampuz, A., & Renz, N. (2019). Origin and characteristics of haematogenous periprosthetic joint infection. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(7), 845-850. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.10.010>
- Ramdani-Bouguessa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, M.-E., Lina, G., Vandenesch, F., Tazir, M., & Etienne, J. (2006). Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3), 1083-1085.
- Ramessar, K., & Olaniran, A. O. (2019). Antibigram and molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(9), 142. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2715-9>
- Ramirez-Sanchez, C., Gonzales, F., Buckley, M., Biswas, B., Henry, M., Deschenes, M. V., Horne, B., Fackler, J., Brownstein, M. J., & Schooley, R. T. (2021). Successful treatment of Staphylococcus aureus prosthetic joint infection with bacteriophage therapy. *Viruses*, 13(6), 1182.
- Reinoso, E. B., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C., & Zschöck, M. (2008). Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research*, 163(3), 314-322.
- Reynolds, P. E., & Somner, E. A. (1990). Comparison of the target sites and mechanisms of action of glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Drugs under experimental and clinical research*, 16(8), 385-389.
- Ricciardi, B. F., Muthukrishnan, G., Masters, E., Ninomiya, M., Lee, C. C., & Schwarz, E. M. (2018). Staphylococcus aureus evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: Biofilm and beyond. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 11, 389-400.
- Roche, F. M., Massey, R., Peacock, S. J., Day, N. P., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M., & Foster, T. J. (2003). Characterization of novel LPXTG-containing

- proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology*, *149*(3), 643-654.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K.-M., Heilmann, C., Herrmann, M., & Mack, D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular microbiology*, *55*(6), 1883-1895.
- Romero-González, A. T. (2020). Biofilm y resistencia antimicrobiana. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, *24*(4).
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, *9*(1), 522-554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Saginur, R., StDenis, M., Ferris, W., Aaron, S. D., Chan, F., Lee, C., & Ramotar, K. (2006). Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(1), 55-61.
- Sanders, C. C. (1988). Ciprofloxacin: In vitro activity, mechanism of action, and resistance. *Reviews of infectious diseases*, *10*(3), 516-527.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Schilcher, K., Andreoni, F., Dengler Haunreiter, V., Seidl, K., Hasse, B., & Zinkernagel, A. S. (2016). Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(10), 5957-5967.
- Seilie, E. S., & Wardenburg, J. B. (2017). *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Seminars in cell & developmental biology*, *72*, 101-116.
- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U. F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., & De Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: The role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert review of anti-infective therapy*, *13*(5), 605-613.
- Shen, H., Tang, J., Wang, Q., Jiang, Y., & Zhang, X. (2015). Sonication of explanted prosthesis combined with incubation in BD bactec bottles for pathogen-based diagnosis of prosthetic joint infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(3), 777-781. <https://doi.org/10.1128/JCM.02863-14>
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Gemmell, C. G., & Lang, S. (2009). Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *International journal of antimicrobial agents*, *33*(4), 374-378.

- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International journal of medical microbiology*, 292(2), 107-113.
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*, 358(9276), 135-138.
- Suresh, M. K., Biswas, R., & Biswas, L. (2019). An update on recent developments in the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 309(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>
- Tande, A. J., Osmon, D. R., Greenwood-Quaintance, K. E., Mabry, T. M., Hanssen, A. D., & Patel, R. (2014). Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci. *MBio*, 5(5), e01910-14.
- Tande, A. J., & Patel, R. (2014). Prosthetic joint infection. *Clinical microbiology reviews*, 27(2), 302-345.
- Thabit, A. K., Fatani, D. F., Bamakhrama, M. S., Barnawi, O. A., Basudan, L. O., & Alhejaili, S. F. (2019). Antibiotic penetration into bone and joints: An updated review. *International journal of infectious diseases*, 81, 128-136.
- Trampuz, A., Piper, K. E., Jacobson, M. J., Hanssen, A. D., Unni, K. K., Osmon, D. R., Mandrekar, J. N., Cockerill, F. R., Steckelberg, J. M., & Greenleaf, J. F. (2007). Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *New England Journal of Medicine*, 357(7), 654-663.
- Trampuz, A., & Zimmerli, W. (2005). Prosthetic joint infections: Update in diagnosis and treatment. *Swiss medical weekly*, 135(17-18), 243-251.
- Tuchscher, L., Löffler, B., Buzzola, F. R., & Sordelli, D. O. (2010). Staphylococcus aureus adaptation to the host and persistence: Role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiology*, 5(12), 1823-1832. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.147>
- Urish, K. L., DeMuth, P. W., Kwan, B. W., Craft, D. W., Ma, D., Haider, H., Tuan, R. S., Wood, T. K., & Davis, C. M. (2016). Antibiotic-tolerant Staphylococcus aureus Biofilm Persists on Arthroplasty Materials. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 474(7), 1649-1656. <https://doi.org/10.1007/s11999-016-4720-8>
- Valderas, M. W., Gatson, J. W., Wreyford, N., & Hart, M. E. (2002). The superoxide dismutase gene sodM is unique to Staphylococcus aureus: Absence of sodM in coagulase-negative staphylococci. *Journal of bacteriology*, 184(9), 2465-2472.
- Valle Turrillas, J., Latasa Osta, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano Goñi, C., Penadés, J. R., & Lasa, Í. (2012). Bap, a biofilm matrix protein of Staphylococcus aureus prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor.
- Vasilev, K., Cook, J., & Griesser, H. J. (2009). Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert review of medical devices*, 6(5), 553-567.
- Veringa, E. M., & Verhoef, J. (1986). Influence of subinhibitory concentrations of clindamycin on opsonophagocytosis of Staphylococcus aureus, a protein-A-dependent process. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 30(5), 796-797.

- Vila, J., Soriano, A., & Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(1), 48-55.
- Villa, J. M., Pannu, T. S., Theeb, I., Buttaró, M. A., Oñativia, J. I., Carbo, L., Rienzi, D. H., Fregeiro, J. I., Kornilov, N. N., Bozhkova, S. A., Sandiford, N. A., PiuZZi, N. S., Higuera, C. A., & Kendoff, D. O. (2021). International Organism Profile of Periprosthetic Total Hip and Knee Infections. *The Journal of Arthroplasty*, 36(1), 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2020.07.020>
- Walsh, C. T., & Wencewicz, T. A. (2016). *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. Washington, DC: ASM Press.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Watts, A., Ke, D., Wang, Q., Pillay, A., Nicholson-Weller, A., & Lee, J. C. (2005). Staphylococcus aureus strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and immunity*, 73(6), 3502-3511.
- Wei, Q., & Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20983-21005.
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35-48.
- Xu, K. D., Franklin, M. J., Park, C.-H., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2001). Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS microbiology letters*, 199(1), 67-71.
- Yamaguchi, T., Ono, D., & Sato, A. (2020). Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) analysis of MRSA. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols: Cutting-Edge Technologies and Advancements*, 59-78.
- Yasir, M., Dutta, D., & Willcox, M. D. (2021). Enhancement of antibiofilm activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* by administration of antimicrobial peptides. *Antibiotics*, 10(10), 1159.
- Yoong, P., & Torres, V. J. (2015). Counter inhibition between leukotoxins attenuates *Staphylococcus aureus* virulence. *Nat Commun* 6: 8125.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *The EMBO journal*, 17(22), 6437-6448.
- Zeller, V., Kerroumi, Y., Meyssonier, V., Heym, B., Metten, M.-A., Desplaces, N., & Marmor, S. (2018). Analysis of postoperative and hematogenous prosthetic joint-infection microbiological patterns in a large cohort. *Journal of Infection*, 76(4), 328-334.

Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., & Pace, J. L. (2016). Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(12), a026989.

Zhai, Z., Li, H., Qin, A., Liu, G., Liu, X., Wu, C., Li, H., Zhu, Z., Qu, X., & Dai, K. (2014). Meta-analysis of sonication fluid samples from prosthetic components for diagnosis of infection after total joint arthroplasty. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1730-1736. <https://doi.org/10.1128/JCM.03138-13>

Zimmerli, W., & Sendi, P. (2017). Orthopaedic biofilm infections. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 125(4), 353-364. <https://doi.org/10.1111/apm.12687>

Zimmerli, W., Trampuz, A., & Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. *New England Journal of Medicine*, 351(16), 1645-1654.

10. Material suplementario

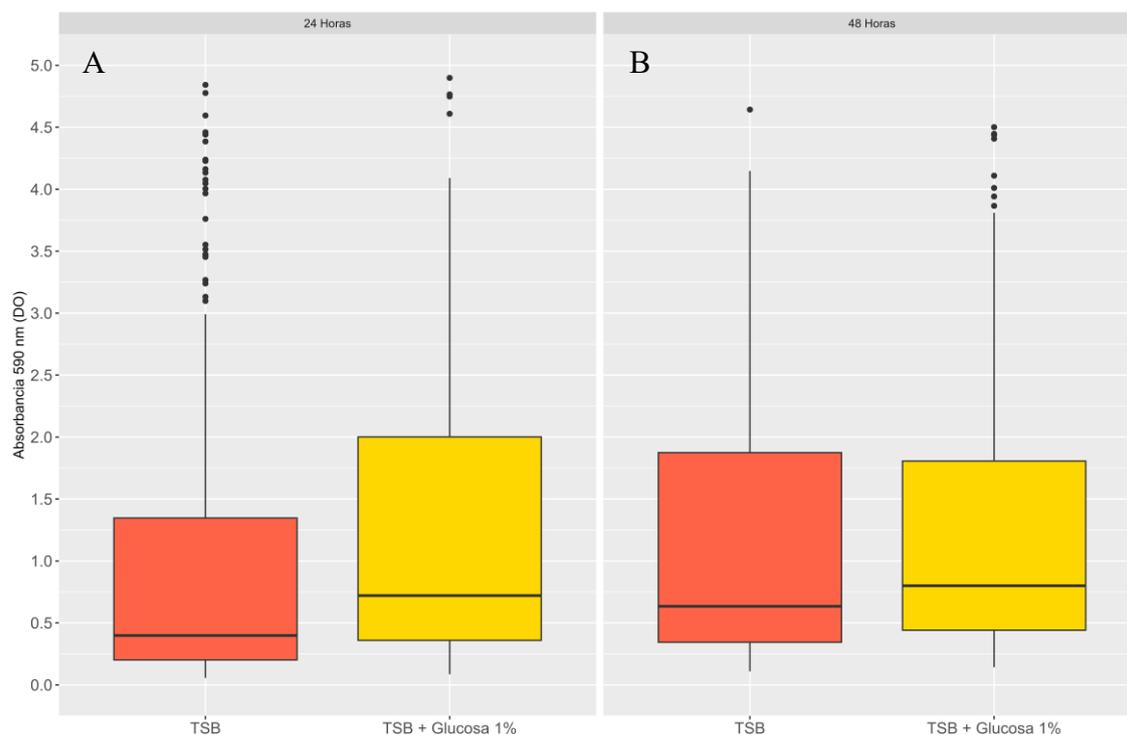


Figura S1. Evaluación de las condiciones óptimas para la formación de biofilms *in vitro*, comparación de medio TSB vs TSB + Glucosa 1% a 24 y 48 horas de tiempo final de incubación. Gráfica A, medio TSB vs TSB + Glucosa 1% a tiempo final de incubación de 24 horas. Gráfica B, medio TSB vs TSB + Glucosa 1% a tiempo de incubación de 48 horas.

Tabla S2. Valores de DO de las cepas aisladas clasificadas según criterio el Villegas et al., (2013) para determinar capacidad formadora de biofilms para la condición de medio de cultivo TSB + Glucosa 1% a tiempo final de incubación de 24 horas. Por motivos de laboratorio no se utilizó muestra 6 ni tampoco muestra 16 más que para la identificación del agente etiológico.

Cepa	A. Etiológico	DOc	DO_Cepa	Villegas
Muestra 2	<i>S. aureus</i>	0.0434	0.206	F
Muestra 5	<i>S. aureus</i>	0.0434	2.042	F
Muestra 7	<i>S. epidermidis</i>	0.0434	0.408	F
Muestra 8	<i>S. epidermidis</i>	0.0434	0.237	F
Muestra 9	<i>S. epidermidis</i>	0.0434	0.170	M
Muestra 12 (A)	<i>S. aureus</i>	0.0434	2.220	F
Muestra 17	<i>S. aureus</i>	0.0434	0.686	F
Muestra 18	<i>S. aureus</i>	0.0434	0.837	F
Muestra 19	<i>C. xerosis</i>	0.0434	3.809	F
Muestra 20	<i>S. epidermidis</i>	0.0434	0.504	F
Muestra 3	<i>K. pneumoniae</i>	0.0434	0.768	F
Muestra 4	<i>C. xerosis</i>	0.0434	2.033	F
Muestra 12 (B)	<i>P. aeruginosa</i>	0.0434	2.281	F
Muestra 15	<i>S. epidermidis</i>	0.0434	1.003	F

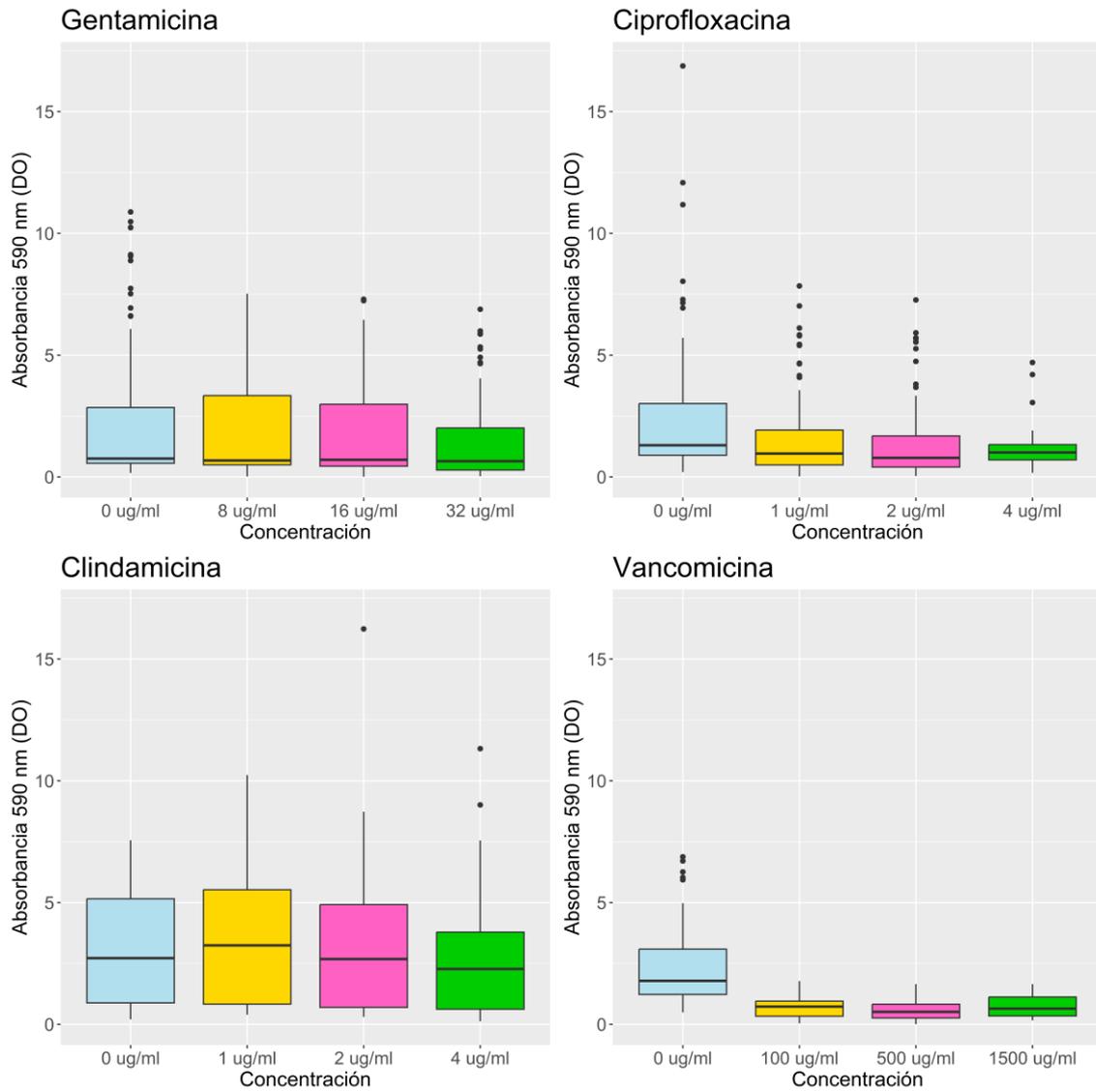


Figura S3. Medidas de absorbancia a 590 nm para el análisis estadístico del efecto inhibitorio sobre la biomasa del biofilm *in vitro* en presencia de los antibióticos Gentamicina, Ciprofloxacina, Clindamicina y Vancomicina.

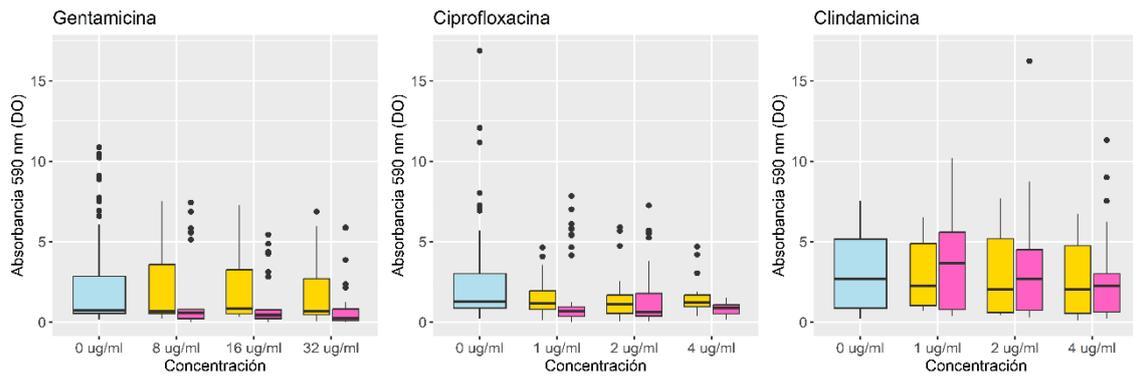


Figura S4. Medidas de absorbancia a 590 nm para el análisis estadístico del efecto inhibitorio sobre la biomasa del biofilm *in vitro* en presencia de los antibióticos Gentamicina, Ciprofloxacina y Clindamicina de cepas sensibles y resistentes.