

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS ORALES EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE *Staphylococcus aureus* EN MODELO *IN VITRO*”

POR

DR. EDUARDO PÉREZ ALBA

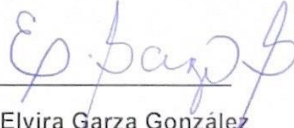
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN MEDICINA**

“EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS
ORALES EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE
Staphylococcus aureus EN MODELO *IN VITRO*”


Aprobación de la tesis:



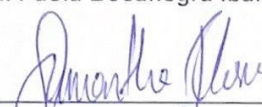
Dr. med. Adrián Camacho Ortiz
Director de la tesis




Dra. Elvira Garza González




Dra. Paola Bocanegra Ibarias



Dra. Samantha Flores Treviño



Dr. José Vilchez Cavazos



Dr. med FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dedicatoria

El presente trabajo representa el trabajo duro de muchas personas a quienes agradezco profundamente por su esfuerzo.

A mi director de tesis y mentor, el Dr. Adrian Camacho Ortiz por predicar el trabajo duro con el ejemplo, como el gran líder que es.

A las doctoras Flores, Bocanegra y Villarreal por su tiempo, paciencia y dedicación para esta investigación y para enseñarme el valor de un Doctor y de un buen colega químico.

Finalmente, gracias a mi familia por ser pilar de fortaleza. A mis padres por su dedicación y amor y a mi esposa y mi hija por ser motor, inspiración y fuerza para este y todos mis quehaceres.

Contenido

RESUMEN.....	6
INTRODUCCION	7
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS.....	16
VARIABLES.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
Grupo de Estudio	18
Procedimientos	19
Procesamiento y cultivo de muestras clínicas de infecciones óseas	19
Identificación a nivel especie de los aislamientos clínicos obtenidos de infecciones óseas	20
Determinación de la producción de biopelícula en los aislamientos de <i>S. aureus</i> obtenidos de infecciones óseas	21
Determinación de la composición de la biopelícula de <i>S. aureus</i> obtenidos de infecciones óseas	23
Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas de aislamientos de <i>S. aureus</i> obtenidos de infecciones óseas	24
Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula de aislamientos de <i>S. aureus</i> obtenidos de infecciones óseas	26
Análisis Estadístico	27
RESULTADOS	28
Aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> obtenidos de infecciones óseas.....	28
Producción de biopelícula de los aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> obtenidos de infecciones óseas.....	29
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con infecciones protésico articulares causadas por cepas de <i>Staphylococcus</i>	29
Composición de biopelícula de los aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus</i> obtenidos de infecciones óseas.....	30
Figura 1. Composición de sustancias poliméricas extracelulares de biopelícula de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp. obtenidos a partir de infecciones articulares protésicas	30
Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas y de biopelícula.....	31
Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
Tabla 3. Comparación de la concentración mínima inhibitoria en células planctónicas y concentración mínima de erradicación de biopelícula en células de <i>S. aureus</i>	32

Figura 2. Distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima de Erradicación de Biopelículas (CMEB) en aislamientos de <i>S. aureus</i> obtenidos a partir de infecciones articulares protésicas.....	33
Erradicación de biopelícula de <i>S. aureus</i> con combinaciones de antibióticos	34
Tabla 4. Erradicación de biopelícula en aislamientos de <i>S. aureus</i> con combinación de antibióticos	35
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	40
BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

Staphylococcus aureus es miembro de la microbiota humana normal de la piel y mucosas. Tiene la capacidad de adherirse a la superficie de los tejidos del hospedero por medio de adhesinas específicas. La colonización inicia en etapas tempranas de la vida de los humanos y provee beneficios como competir con patógenos más virulentos que podrían establecerse en la piel. Sin embargo, los aislamientos de *S. aureus* también pueden tener altas tasas de resistencia a antibióticos.

Con el uso de los dispositivos médicos implantables como las prótesis articulares y los dispositivos de fijación de fracturas, *S. aureus* está establecido como un importante patógeno. En este estudio, el objetivo fue determinar el efecto de la combinación de antibióticos orales en la biopelícula de aislamientos de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas en un modelo *in vitro*. Primero se determinó el perfil de susceptibilidad en células planctónicas de *S. aureus* a diferentes antibióticos solos y después se determinó la susceptibilidad en células de biopelícula para determinar la concentración mínima de erradicación de biopelícula. Para ambos experimentos se seleccionaron nueve antibióticos correspondientes a los siguientes grupos de antibióticos: penicilinas, macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, lincosamidas, inhibidores de folato, ansamicinas y oxazolidinonas.

El estudio se realizó con el objetivo de demostrar que el efecto de antibióticos orales sobre células planctónicas de *S. aureus* es mayor que sobre células de biopelícula en un modelo *in vitro*.

INTRODUCCION

Staphylococcus aureus es miembro de la microbiota humana normal de la piel y mucosas (Arciola *et al.* 2018). Tiene la capacidad de adherirse a la superficie de los tejidos del hospedero por medio de adhesinas y autolisinas. Los aislamientos de *S. aureus* pueden tener altas tasas de resistencia a antibióticos.

Con el uso de los dispositivos médicos implantables como las prótesis articulares y los dispositivos de fijación de fracturas, *S. aureus* tiene un papel importante como patógeno por su virulencia (Kapadia *et al.* 2016). El dispositivo médico implantado facilita la infección, ya que las células bacterianas introducidas durante la cirugía se adhieren y crecen en la superficie del dispositivo formando biopelícula (Arciola *et al.* 2018). La presencia de *S. aureus* en la piel humana, el aumento en el uso de dispositivos médicos implantables y las altas tasas de resistencia a antibióticos conforman un problema clínico que probablemente tardará generaciones en ser resuelto.

Bajo condiciones de salud, la microbiota comensal de la piel es beneficiosa para los humanos ya que ayuda a la nutrición, compete con patógenos y participa a la educación del sistema inmune. Para persistir en la piel humana, *S. aureus* ha evolucionado diversos mecanismos para censar y superar las defensas antimicrobianas físicas y químicas del hospedero. Estos mecanismos incluyen estrategias contra la desecación y el estrés osmótico, adhesinas de superficie que le permiten adjunción al hospedero, sistemas para censar péptidos antimicrobianos, moléculas de comunicación (e.g. hormonas) del hospedero y posee mecanismos para internalizarse en los osteoblastos (Arciola *et al.* 2018). Además, una vez identificados los péptidos antimicrobianos, *S. aureus* monta mecanismos para evadir su

acción (e.g. la proteasa SpA que es inducida y dirigida contra la dermicidina humana) (Kavanagh *et al.* 2018).

Staphylococcus epidermidis tiene influencia sobre la colonización del hospedero por otras especies, como *Staphylococcus aureus*. Existe correlación negativa entre algunas cepas de estas dos especies en humanos. Este efecto es parcialmente debido a la secreción de factores, como las modulinas solubles en fenol, que impactan en la capacidad de colonización de otros organismos por actuar en las células del hospedero, son importantes para la maduración de la biopelícula y desempeñan un rol en la competencia entre los microorganismos de la piel humana (Sabaté Brescó *et al.* 2017).

En contraste a su rol como microorganismo comensal, *S. epidermidis* y otros *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCoN) pueden causar infecciones invasivas en un grupo selecto de pacientes. Estos grupos de alto riesgo incluyen neonatos pre-término, individuos inmunocomprometidos y pacientes con dispositivos médicos implantados (Sabaté Brescó *et al.* 2017). A diferencia de *S. aureus*, que típicamente produce numerosas enzimas y toxinas extracelulares que le permiten establecer infecciones invasivas en hospederos saludables, *S. epidermidis* tiene un número limitado de factores de virulencia y normalmente es incapaz de causar infección invasiva en hospederos saludables (Kavanagh *et al.* 2018; Sabaté Brescó *et al.* 2017).

S. aureus es la principal especie más frecuente en infecciones relacionadas a dispositivos ortopédicos (IRDO), seguido de *S. epidermidis* que causa aproximadamente del 20 al 30% de las IRDOs (Kapadia *et al.* 2016). La frecuencia de infecciones por *S. epidermidis* es hasta del 50% en las infecciones de desarrollo tardío. Estas infecciones tardías se han asociado a la naturaleza subaguda de *S. epidermidis*, que se pueden presentar meses

después de la cirugía con signos sutiles de infección. En contraste, en las infecciones por *S. aureus*, el curso es agudo (Kavanagh *et al.* 2018).

El diagnóstico de IRDO se basa en la combinación de la presentación clínica, el cultivo de biopsia o del dispositivo, el análisis histológico y el resultado de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (Kapadia *et al.* 2016). El diagnóstico de las infecciones subagudas representa un reto debido a la falta de signos clínicos obvios de infección. Por lo anterior, el resultado de los cultivos microbiológicos es frecuentemente el criterio diagnóstico crítico. Debido a que los microorganismos crecen en biopelícula en el material implantado y en el tejido óseo necrótico, el desarrollo y la identificación de los patógenos causantes de enfermedad puede requerir múltiples muestras de tejido para cultivo e incluso remoción del implante (Kavanagh *et al.* 2018).

Para aumentar el rendimiento diagnóstico de los cultivos se recomienda suspender tratamientos antibacterianos antes de la toma de muestras, tomar al menos tres biopsias de tejido y sonicar el material de osteosíntesis para desprender las bacterias asociadas a biopelícula de su superficie (Osmon *et al.* 2013). *S. epidermidis* puede contaminar la biopsia durante la toma de muestra si no se siguen técnicas asépticas, por lo que para confirmar a esta especie como agente causal, debe recuperarse de dos biopsias separadas para diferenciar entre infección o contaminación (Weber 2016).

El tratamiento de las IRDO por *S. aureus* depende de la situación clínica y en algunos casos se requiere la remoción del material implantado con un mínimo de 6 semanas de antibioticoterapia (Osmon *et al.* 2013). A pesar de una terapia tan prolongada, la infección recurre en aproximadamente un tercio de los casos y hasta un quince por ciento de ellos no logra la cura (Morgenstern *et al.* 2016).

En una serie de pacientes, *S. epidermidis* estuvo asociada con tasas de curación más bajas que *S. aureus* (75% contra 84% respectivamente), aunque la infección por *S. aureus* estuvo asociada con una mortalidad cinco veces mayor. Estos datos apoyan la idea de que *S. epidermidis* es un agente de infecciones sub-agudas con peores desenlaces terapéuticos, aunque esas infecciones pongan en menor riesgo la vida en comparación a *S. aureus* (Morgenstern *et al.* 2016).

Como un potencial microorganismo comensal, *S. aureus* tiene la habilidad de adherirse a las proteínas del hospedero en la piel. En una herida quirúrgica, la bacteria utiliza este mecanismo para adherirse a tejidos profundos y a dispositivos implantados. La adhesión a la superficie de los implantes está mediada por interacciones no específicas como interacciones hidrofóbicas y por adhesinas específicas como la autolisina (AtlA), el DNA extracelular (eDNA) y las proteínas estafilocócicas de superficie 1 y 2 (SSP-1, SSP-2). La AtlA y las SSP-1 y SSP-2 se adhieren a superficies nativas, mientras que el eDNA es generado en *S. aureus* a través de la lisis mediada por AtlA, lo cual promueve la formación de biopelícula en la población remanente (Arciola *et al.* 2018; Sabaté Brescó *et al.* 2017). En el contexto de los dispositivos médicos, inmediatamente después de implantarlos, la superficie se cubre con proteínas plasmáticas derivadas del hospedero, proteínas de matriz extracelular y productos de la coagulación (Arciola *et al.* 2018).

La habilidad de adherirse a una superficie es el primer paso en la formación de biopelícula, el cual es uno de los factores de virulencia más importantes de *S. aureus*. El desarrollo de biopelícula facilita la resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero y confiere resistencia a los antibióticos. La formación de biopelícula también complica los protocolos de tratamiento médico y quirúrgico debido a que frecuentemente se requiere el retiro del implante para retirar la biopelícula (Arciola *et al.* 2018).

Las biopelículas son comunidades complejas de bacterias adheridas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares de producción propia (Magana *et al.* 2018). La acumulación y maduración de la biopelícula de *S. aureus* ocurre por medio de distintos mecanismos. El polisacárido de adhesina intracelular (PIA) es responsable de formación de biopelícula en los aislamientos de *S. aureus*. Además de lo anterior, las modulinas solubles en fenol contribuyen a la dispersión de las biopelículas en conjunto con las proteasas y las nucleasas (Arciola *et al.* 2018; Sabaté Brescó *et al.* 2017). La PIA puede contribuir a la evasión del sistema inmune innato promoviendo la generación del fragmento C5a del complemento, inhibiendo los fagocitos y neutrófilos, y reduciendo la actividad de los péptidos antimicrobianos del hospedero (Kavanagh *et al.* 2018).

Aunque la mayoría de las cepas de *S. aureus* son susceptibles a los antibióticos más novedosos como daptomicina, tigeciclina, linezolid y dalbavancina, la resistencia a meticilina sigue siendo una de las características más importantes de las cepas que se aíslan de infecciones, es decir, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) (Molina-Manso *et al.* 2013). La resistencia a eritromicina, ciprofloxacino, clindamicina o trimetoprim/sulfametoxazol están comúnmente asociadas a la resistencia a meticilina. Esta resistencia está codificada por el gen *mecA*, el cual codifica a una proteína de unión a la penicilina alterna con afinidad disminuida a los β -lactámicos.

La interacción entre *S. aureus* como comensal con el sistema inmune del humano tiene un rol en el desarrollo de tolerancia inmunológica. Sin embargo, las respuestas inmunes innatas se logran disparar por la detección de estructuras microbianas por medio de los receptores de reconocimiento de patrones en las células tisulares e inmunes. *S. aureus* desencadena la respuesta inmune en parte por los receptores tipo Toll-like 2 (Kavanagh *et al.* 2018). La naturaleza crónica usual de las osteomielitis por *S. aureus* eventualmente lleva a

un ambiente inflamatorio en el hueso. Las citosinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF)- α , Interleucina (IL)-1 β , e IL-6 son potentes estimuladores de la osteólisis por medio de la activación de los osteoclastos. Por el contrario, la función de las células productoras de matriz ósea, los osteoblastos, se ven afectados por TNF- α y IL-1 β . Por lo tanto, los niveles persistentemente elevados de citosinas pro-inflamatorias en el microambiente óseo frecuentemente resultan en osteólisis marcada (Kavanagh *et al.* 2018).

Una vez que se establece el diagnóstico de infección, se toman en cuenta diferentes factores para un tratamiento efectivo y el éxito terapéutico depende en gran manera en el desbridamiento del tejido infectado y la resección quirúrgica de hueso necrótico o retiro de material protésico (Osmon *et al.* 2013).

En una revisión de osteomielitis crónica que incluyó todos los ensayos aleatorizados o cuasi-aleatorizados de diferentes terapias de antibióticos se encontraron ocho trabajos aplicables con un total de 282 pacientes. La mayoría de los ensayos tenían más de 20 años y se concluyó que la calidad de los trabajos no era suficiente para emitir recomendaciones (Conterno and Turchi 2013).

Existe poca evidencia para definir el antibiótico de elección, la duración del tratamiento y la vía de administración. La guía ampliamente aceptada y utilizada es la de diagnóstico y manejo de infección de articulación protésica de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA por sus siglas en inglés) (Osmon *et al.* 2013), aunque muchas de las decisiones tomadas en la vida diaria están basadas en opiniones de expertos.

La selección de antibióticos para el tratamiento debe guiarse por los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y su penetración a hueso. Múltiples estudios de farmacocinética midieron la penetración de los diferentes antibióticos al tejido óseo y la mayoría de ellos mostraron concentraciones que excedían los puntos de corte de la

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los patógenos que comúnmente causan infecciones en este sitio (Thabit *et al.* 2019). Sin embargo, no todos los ensayos que analizan la penetración de los antibióticos a hueso son iguales ya que existe una falta de estandarización en las metodologías. Además, algunos de estos ensayos utilizan sujetos sanos para determinar sus resultados, lo cual no necesariamente refleja cómo se comportarán los antimicrobianos en un sujeto con osteomielitis.

Aunque clásicamente se recomendaba la terapia parenteral como el estándar de tratamiento, existe nueva evidencia reciente que sugiere el potencial éxito terapéutico de la terapia oral. El estudio OVIVA (*Oral versus Intravenous Antibiotics for Bone and Joint Infection*) es un ensayo aleatorizado, multicéntrico, de no inferioridad, con más de 1,000 pacientes de más de 20 centros del Reino Unido que compara el tratamiento de osteomielitis con antibióticos orales o intravenosos (Li *et al.* 2019). Este estudio, que es la evidencia más fuerte al momento, determinó que en pacientes cuidadosamente seleccionados se pueden utilizar antibióticos orales con alta biodisponibilidad y buena penetración a hueso como tratamiento de infecciones óseas o articulares. Esto brinda una opción que disminuye costos y complicaciones como infecciones asociadas a los cuidados de la salud o asociadas a dispositivos intravenosos. Sin embargo, la elección de antibióticos en el estudio OVIVA fue guiada por la recomendación de los infectólogos tratando cada caso, por lo que cada tratamiento fue individualizado (Seaton *et al.* 2019).

Algunos de los factores a tomar en cuenta en la selección de la terapia antimicrobiana se enlistan a continuación. Los agentes orales deben ser elegidos de manera cuidadosa para garantizar alta biodisponibilidad, adecuada penetración a hueso y una relación dosis-respuesta óptima. Aunque los β -lactámicos son altamente efectivos cuando se administran

vía intravenosa, pueden no alcanzar concentraciones adecuadas en hueso al ser administrados por vía oral.

La rifampicina es usada en el manejo de las IRDO en combinación con otros agentes para reducir el riesgo de resistencia. Este antibiótico reduce la concentración de un número importante de antibióticos a través de la inducción de los sistemas enzimáticos del citocromo P450, incluyendo a linezolid, tetraciclinas y clindamicina. Otros antibióticos frecuentemente utilizados para las infecciones de hueso y articulaciones son las fluoroquinolonas y las tetraciclinas; sin embargo, éstas son queladas y se disminuye su absorción cuando se prescriben en conjunto con varios cationes divalentes y trivalentes, notablemente el hierro y el calcio. Cuando se prescriben fluoroquinolonas se deben considerar además la prolongación del intervalo QTc, el riesgo de tendinopatía, la ruptura de aneurisma aórtico, los eventos adversos psiquiátricos e infección por *Clostridioides difficile*. Al utilizar linezolid se debe vigilar por riesgo de toxicidad neurológica y hematológica, así como el riesgo de síndrome serotoninérgico cuando se co-administra con otros agentes como morfina o antidepresivos (Seaton *et al.* 2019).

HIPÓTESIS

Hipótesis principal: El efecto de antibióticos orales sobre las células planctónicas de *S. aureus* será mayor que sobre células de biopelícula en un modelo *in vitro*.

Hipótesis alternativa: El efecto de antibióticos orales sobre las células planctónicas de *S. aureus* no será mayor que sobre células de biopelícula en un modelo *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo Principal:

- Determinar la actividad de antibióticos orales sobre las células planctónicas y de biopelícula de *S. aureus* en un modelo *in vitro*.

Objetivos Secundarios:

- Clasificar los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas de acuerdo con su producción de biopelícula.
- Determinar la composición de la biopelícula de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas en un modelo *in vitro*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de antibióticos sobre las células planctónicas de *S. aureus*.
- Determinar la concentración mínima de erradicación de biopelícula de antibióticos sobre las células de biopelícula de *S. aureus*.
- Evaluar el efecto de la combinación de antibióticos sobre la erradicación de biopelícula de *S. aureus*.

VARIABLES

Las variables para estudiar sobre los aislamientos serán:

- Identificación a nivel especie los aislamientos obtenidos de muestras clínicas de infecciones óseas.
- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima de Erradicación de Biopelículas (CMEB) de oxacilina, azitromicina, eritromicina, doxiciclina, levofloxacino, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, rifampicina, linezolid y sus combinaciones.
- Producción de biopelícula de los aislamientos (no productor, productor débil, productor fuerte).
- Composición de biopelículas (porcentaje de carbohidratos, proteínas y ácido desoxirribonucleico).

MATERIAL Y MÉTODOS

Grupo de Estudio

1. Criterios de inclusión: Cepas de *S. aureus* obtenidas de pacientes adultos con diagnóstico de osteomielitis o infección asociada a material de osteosíntesis.
2. Criterios de exclusión: Pacientes pediátricos, embarazadas, o población sujeta a coacción.
3. Criterios de eliminación: Pacientes cuyas cepas sean no viables para realizar el total de los experimentos.
4. Lugar de referencia y método de reclutamiento: Se dio una sesión informativa a los médicos del Departamento de Traumatología y Ortopedia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” para solicitar que, ante la sospecha de infecciones osteoarticulares, se enviaran las muestras de hueso y material de osteosíntesis a cultivo al Laboratorio de Infectología como parte de la atención usual que recibirían todos sus pacientes. Una vez identificado el agente causal, en caso de tratarse de *S. aureus*, se realizó una evaluación clínica del sujeto para verificar si cumplía los criterios de inclusión y la ausencia de criterios de exclusión. Se buscó al sujeto y se le invitó a participar al estudio. Se le explicó que el propósito de este estudio era analizar bacterias causantes de infecciones en hueso y articulaciones. Se le expuso que se le estaba estableciendo una invitación a un estudio debido a que en una muestra que se le tomó como parte normal de su atención se encontró una bacteria causando infección. Se le aclaró que la investigación en la que participaría era importante porque con los resultados obtenidos se esperaba encontrar información que en un futuro ayude a determinar cuáles son los mejores tratamientos para las personas que sufren infección en huesos y articulaciones.

Se añadió que su tratamiento no se verá alterado por entrar al protocolo y que se requería su autorización verbal para almacenar la bacteria que se encontró como causante de su infección y hacerle pruebas adicionales, pero que no se realizaría ninguna intervención sobre el participante. Se aclaró también que no se almacenarían muestras de sangre o tejidos, solamente cepas de bacterias.

Se solicitó al paciente su asentimiento verbal frente a dos testigos imparciales para poder incluirlo en la investigación.

5. Confidencialidad: No se utilizó el nombre o registro del hospital para la recolección o identificación de la cepa de *S. aureus* dentro del estudio. No se recolectó ningún demográfico del paciente o algún otro dato que pudiera llevar a la identificación de la cepa con el participante. El número de personas con acceso a la información estuvo limitado al investigador principal y co-investigadores. Por último, los registros de papel se mantuvieron en un lugar cerrado y protegido en el Servicio de Infectología.

Procedimientos

Procesamiento y cultivo de muestras clínicas de infecciones óseas

Se recibieron muestras de hueso y de implantes óseos que fueron obtenidos bajo técnicas estériles durante procedimientos quirúrgicos. Se solicitó a los médicos tratantes que, en caso de enviar tejido, óptimamente se enviaran cinco muestras diferentes para mejorar en rendimiento de los cultivos, ⁶.

En una campana de bioseguridad, se removió la tapa del contenedor estéril con el material de osteosíntesis o hueso explantado y se añadieron 400 mL de solución Hartmann estéril. Cuando se trató de muestras pequeñas se colocaron en un tubo estéril de 10 mL y se

cubrió la muestra con 10 mL de caldo soya tripticasa. Se colocó nuevamente la tapa del contenedor y se dio vórtex por 30 s, para luego sonicar por 5 min y nuevamente dar vórtex por 30 s. Utilizando una técnica estéril, se tomó una alícuota de 50 mL del líquido sonicado en un tubo de centrifuga de 50 mL. En caso de muestras pequeñas se centrifugaron los 10 mL completos. Se centrifugó el tubo a una fuerza centrífuga relativa de 3,000 por 15 min. Se decantó y se dejó 0.5mL de sobrenadante. Se colocó una gota del sobrenadante en una laminilla para realizar tinción de Gram y se colocó 0.1 mL en agar sangre, chocolate y Brucella. Se incubó el agar chocolate y sangre con CO₂ al 5% y el agar Brucella en condiciones de anaerobiosis por hasta 14 días. Se reportó la tinción de Gram una vez interpretada y se revisaron las placas diariamente en búsqueda de desarrollo⁶.

Identificación a nivel especie de los aislamientos clínicos obtenidos de infecciones óseas

De todas las colonias aisladas se realizó la identificación a nivel especie a través de espectrometría de masas de la desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo: MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) (Zhu *et al.* 2015). Se tomó como una identificación confiable de género y especie un score ≥ 2.0 , el score entre 1.5 – 2.0 se tomó como una identificación segura de género, pero probable de especie y un score ≤ 1.5 como una identificación no confiable.

A partir de un cultivo joven de 24 h de incubación en agar sangre se tomaron de 1-2 colonias aisladas y se transfirieron con un aplicador de madera a la placa del equipo de 96 pocillos de acero inoxidable. Cada aislamiento se colocó en cada uno de los pocillos. Posteriormente se añadió 1 μ L de ácido fórmico al 70% a cada pocillo para facilitar la extracción proteica y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Se adicionó 1 μ L

de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico), y se dejó secar por completo. Se utilizó como control un extracto proteico de *Escherichia coli* DH5 α . La placa se introdujo en el equipo, se controló mediante el software flexControl 3.4 y se analizó mediante el software MALDI biotyper 4.0 comparando los espectros de proteínas de los aislamientos con la base de datos del equipo¹⁴.

A los aislamientos que obtuvieron un score <2.00 sin obtener identificación confiable, se les realizó la extracción de proteínas en tubo. Para esto se transfirieron de 1 a 3 colonias a partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre a un tubo Eppendorf con 300 μ L de agua destilada y se adicionaron 900 μ L de etanol, se homogenizó en vórtex durante 30 s. La suspensión se centrifugó a 13,000 RPM durante 2 min, se decantó el etanol, se eliminó el exceso con una micropipeta y se dejó secar por completo a temperatura ambiente. Seguido, al precipitado se le añadieron 50 μ L de ácido fórmico al 70%, se homogenizó en vórtex durante 30 s y se dejó incubar durante 5 min. Después se le añadieron 50 μ L de acetonitrilo al 100%, se dio vórtex durante 30 s y se centrifugó a 13,000 RPM durante 2 min. Se tomó 1 μ L del sobrenadante y se colocó en la placa del equipo, se dejó secar y se le añadió 1 μ L de la matriz y se dejó secar por completo. Posteriormente se re-analizó en el equipo.

Determinación de la producción de biopelícula en los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas

La producción de biopelícula se determinó de forma semicuantitativa mediante la tinción con cristal violeta (Christensen *et al.* 1985). A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se transfirió una colonia a caldo soya tripticasa y se incubó a 35 °C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se realizó una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticasa suplementado con 1% de glucosa. De esta dilución se transfirieron 200 μ L y se

colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Corning® Costar®, NY, USA). Se realizaron cuatro repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control con medio sin inocular. La placa se incubó a 35 °C por 24 h. Después de la incubación se determinó la densidad óptica (DO) de las células planctónicas, para esto se transfirieron 100 µL de uno de los cuatro pocillos de cada aislamiento, se homogenizó sin tocar las paredes internas del pocillo, a otra microplaca estéril la cual se midió la DO en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) a 595 nm. Para determinar la DO de la biopelícula se descartó el medio de cultivo sobrenadante de la microplaca y se invirtió sobre papel secante dando unos golpes para eliminar el exceso de líquido. Posteriormente se realizó la fijación de la biopelícula adicionando 200 µL de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, posteriormente se descartó el metanol y se retiró el exceso de líquido. Seguido se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y quitando el exceso de agua. Después se le añadió 200 µL de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 µL de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente con la finalidad de disolver la biopelícula. Se realizó la lectura de la DO a 595 nm. El criterio de evaluación se llevó a cabo mediante los siguientes rangos de clasificación, DO < 0.120 se consideró no productor, en el rango 0.120 a 0.240 como productor débil, y DO > 0.240 como productor fuerte.

Determinación de la composición de la biopelícula de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas

Se realizaron ensayos de desprendimiento de biopelícula a los aislamientos productores, utilizando distintos sustratos que degradan específicamente cada uno los componentes de la matriz extracelular (carbohidratos, proteínas y ácido desoxirribonucleico).

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se transfirió una colonia a caldo soya tripticasa y se incubó a 35 °C por 24 h, posteriormente a partir del cultivo se realizó una dilución a razón 1:100 en caldo fresco y estéril de soya tripticasa suplementado con 1% de glucosa. De esta dilución se transfirieron 200 µL y se colocaron en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos donde se realizaron cuatro repeticiones de cada aislamiento y se dejó un pocillo como control con medio sin inocular. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado (una como control, una para carbohidratos, una para proteínas y una última para ADN). Las cuatro placas contenían los mismos aislamientos. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. El medio sobrenadante se descartó y se eliminó el exceso de líquido invirtiendo las placas y dando ligeros golpes sobre papel absorbente. Se realizó la fijación de la biopelícula adicionando 200 µl de metanol absoluto a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min, posteriormente se descartó el metanol y se retiró el exceso de líquido. Seguido se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para cada placa, se retiró el exceso de agua y se dejó secar por completo a temperatura ambiente. Una vez secas se le añadió a cada placa 200 µL en cada pocillo con el sustrato correspondiente:

- a) 40 mM de NaIO₄ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en agua bidestilada,
- b) 0.1 mg/mL de proteinasa K (Bioline, Londres, UK) en 20 mM Tris-HCl a pH: 7.5 con 100 mM NaCl y
- c) 0.5 mg/mL DNasa I (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en 5 mM MgCl₂.

Se dejó una placa control sin la adición de sustrato, así como un pocillo como control de esterilidad y como blanco espectrofotométrico, las microplacas se incubaron a 35°C durante 24 h. La placa con la adición de NaIO₄ se cubrió de la luz con papel aluminio para evitar la degradación del sustrato por efecto de ésta.

Transcurridas las 24 h se descartaron los sustratos de cada placa y se realizaron tres lavados a cada placa con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua. Después se le añadió 200 µL de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos de las cuatro placas y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución de cristal violeta y se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril, posteriormente se le añadió a cada pocillo 200 µL de una mezcla de alcohol y acetona a razón 7:3 y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la DO a 595 nm.

El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control. El criterio de evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera: < 10% sin desprendimiento, de 10 a 50% desprendimiento intermedio, de 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y > 75% desprendimiento fuerte. Los porcentajes más altos de desprendimiento se interpretaron como la composición de mayor abundancia de biopelícula (Mendoza-Olazarán *et al.* 2015).

Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas de aislamientos de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas

Se determinó el perfil de susceptibilidad en células planctónicas de *S. aureus* a diferentes antibióticos solos y en combinación. Esto se llevó a cabo mediante los métodos y criterios descritos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus

siglas en inglés), en el documento M100 y M07-A10 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2022).

Se seleccionaron nueve antibióticos correspondientes a los siguientes grupos de antibióticos: penicilinas (oxacilina), macrólidos (azitromicina y eritromicina), tetraciclinas (doxiciclina), fluoroquinolonas (levofloxacino), lincosamidas (clindamicina), inhibidores de folato (trimetoprim/sulfametoxazol), ansamicinas (rifampicina) y oxazolidinonas (linezolid). Se tomó en cuenta al menos un antibiótico de los grupos de mayor relevancia para *Staphylococcus* spp. que se menciona en el documento M100. Se prepararon soluciones stock a una concentración de 1 mg/mL de todos los antibióticos. Para lo cual, se pesó 1 mg de la presentación en polvo de cada antibiótico (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y se diluyó en 1 mL del diluyente correspondiente a cada uno descrito en el manual de procedimientos del CLSI en el documento M100. Las soluciones stock se conservaron en congelación en tubos Eppendorf a -80 °C hasta su uso.

Para determinar el perfil de susceptibilidad en células planctónicas se prepararon las soluciones de trabajo tomando en cuenta dos diluciones por encima y debajo del punto de corte de resistencia de cada antibiótico mencionado en el documento M100 del CLSI. Se realizaron los cálculos correspondientes para cada antibiótico y se diluyó la solución stock en caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. En el caso de oxacilina se diluyó en caldo Müeller-Hinton con cationes ajustados de NaCl 1%. A partir de la dilución de trabajo se tomaron 200 µL de cada antibiótico o la combinación de antibióticos a estudiar y se colocaron cada uno en la primera fila de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo curvo. En las filas restantes se adicionaron 100 µL de caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. Las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 µL de la solución de trabajo que anteriormente se haya colocado en la microplaca (de la fila 1 a la 2, 2 a 3, 3 a 4, etc.),

homogenizando entre cada pase. Se dejaron dos pocillos como control negativo y positivo. Los paneles de antibióticos se guardaron en congelación a -80 °C hasta su uso.

A partir de un cultivo puro de 24 h en agar Müeller-Hinton se realizó la preparación de los inóculos de cada aislamiento por suspensión de tres a cinco colonias en tubos con solución salina estéril al 0.85% ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (0.08-0.13 absorbancia a 525 nm). El inóculo se diluyó a razón 1:150 en caldo Müeller-Hinton fresco y estéril. Seguido se tomaron 100 µL y se transfirieron a cada pocillo del panel de antibióticos dejando un pocillo sin inocular como control negativo. Las placas se incubaron a 35 °C por 18-24 h tratando de no apilar más de cuatro cajas, para evitar diferencia en la temperatura. Posteriormente se determinó la CMI como la concentración de antibiótico en la cual a simple vista no se apreció crecimiento.

Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula de aislamientos de *S. aureus* obtenidos de infecciones óseas

La susceptibilidad en células de biopelícula se llevó a cabo empleando el dispositivo Calgary (MEBC™, Innovotech, AB, Canadá) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para determinar el efecto de distintos antibióticos solos y en combinación en células de biopelícula se permitió que *S. aureus* formara la biopelícula sobre el dispositivo Calgary para que posteriormente se pusiera en contacto con las combinaciones de antibióticos a estudiar. Para esto se partió de un cultivo puro de 24 h en agar sangre se realizó la preparación de los inóculos de cada aislamiento por suspensión de tres a cinco colonias en tubos con solución salina estéril al 0.85% ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (0.08-0.13 absorbancia a 525 nm). El inóculo se diluyó a razón 1:50 en caldo soya tripticasa adicionado con 1% de glucosa. Seguido se tomaron 150 µL, se añadieron a cada

pocillo de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano y se colocó la tapa del dispositivo de Calgary quedando las clavijas inmersas en el medio. Se incubó a 35°C por 24 h sobre un agitador a 150 RPM. Posterior a la incubación las clavijas se enjuagaron dos veces con buffer de fosfatos salino para eliminar las células no adheridas y se dejaron secar a temperatura ambiente. La tapa se transfirió al panel de antibióticos preparado anteriormente y se incubaron las placas a 35°C por 18-24 h. Posteriormente se retiró la tapa del panel de antibióticos y se enjuagaron las clavijas dos veces con buffer de fosfatos salino pH 7.3 y se transfirió la tapa a una microplaca estéril conteniendo 200 µL en cada pocillo caldo Müller-Hinton, la cual se sonicó 10 min en un ultrasonicador (Branson 5800, Danbury, USA), después se retiró la tapa con las clavijas y se cambió a una tapa normal. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Posterior a la incubación se determinó la concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB) como la concentración mínima de antimicrobiano que a simple vista no presentó crecimiento y erradicó la biopelícula.

Análisis Estadístico

Se recolectaron los datos de la susceptibilidad a antibióticos y la tolerancia entre las células de bacterias planctónicas y biopelícula. Se realizó prueba de normalidad de Shapiro Wilks y gráficos Q-Q y en el caso de los datos no paramétricos, al comparar dos grupos, se realizó una prueba de U de Mann–Whitney. El análisis de muestras pareadas se realizó utilizando la prueba de rango con signo de Wilcoxon y para más de 2 grupos se calculó utilizando la prueba de Kruskal–Wallis con una comparación postprueba de Dunn. Se utilizó el software SPSS v 20 (SPSS, Inc., Armonk, NY) para el análisis de datos.

RESULTADOS

Aislamientos clínicos de *Staphylococcus* obtenidos de infecciones óseas

Se obtuvieron un total de 47 aislamientos clínicos de especies de *Staphylococcus* a partir de muestras de infección ósea, de dispositivos ortopédicos o de articulaciones protésicas clínicamente relevantes desde enero de 2019 hasta marzo de 2022 (Tabla 1). De ellos, 37 (78.7%) fueron identificados como *S. aureus*, 5 (10.3%) fueron *Staphylococcus epidermidis*, 3 (6.4%) fueron *Staphylococcus haemolyticus*, 1 (2.1%) fue *Staphylococcus hominis* y 1 (2.1%) fue *Staphylococcus lugdunensis*.

Los pacientes tenían una mediana de edad de 39 años (rango de 19-78 años, RIQ 23), la mayoría de los pacientes eran varones (n=39, 82.9%) y la mayoría estaban hospitalizados en sala de ortopedia (n=45, 95.7%). Uno de los pacientes presentó artritis séptica primaria, dos tenían infecciones de tobillo sin material implantado (osteomielitis primaria por heridas), tres tenían un absceso vertebral, mientras que el 76.5% de los pacientes presentaron una infección por dispositivo ortopédico.

En cuanto a las comorbilidades, nueve pacientes vivían con diabetes, cuatro tenían hipertensión arterial esencial, dos se encontraban privados de la libertad y uno vivía con infección por VIH.

Producción de biopelícula de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de infecciones óseas

Se detectó producción de biopelícula en el 83.0% de todos los aislamientos de *Staphylococcus* (Tabla 1). Casi todos los aislamientos de *S. aureus* produjeron biopelícula (n=36, 97.3%), de los cuales 26 (70.3%) fueron productores fuertes de biopelícula y 10 (27.0%) fueron productores débiles de biopelícula. Solo tres (30%) estafilococos no *aureus* fueron productores de biopelícula, dos fuertes (*S. epidermidis* y *S. lugdunensis*) y uno débil (*S. epidermidis*) productores de biopelícula.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con infecciones protésico articulares causadas por cepas de *Staphylococcus*.

Características	Total n (%)	<i>S. aureus</i> n (%)	Estafilococos no <i>aureus</i> n (%)
No. de pacientes	47	37 (78.7)	10 (21.3)
Masculino	39 (83.0)	32 (68.1)	7 (14.9)
Sala hospitalaria			
Traumatología	45 (95.7)	37 (78.7)	8 (17.0)
Especímenes			
Dispositivos ortopédicos	36 (76.5)	31 (65.9)	5 (10.7)
Tejido óseo o articular	11 (23.4)	6 (12.7)	5 (10.7)
Producción de biopelícula			
Ninguna	8 (14.9)	1 (2.7)	7 (70.0)
Débil	11 (23.4)	10 (27.0)	1 (10.0)
Fuerte	28 (59.6)	26 (70.3)	2 (20.0)

Composición de biopelícula de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus* obtenidos de infecciones óseas

Los principales componentes de biopelícula en todos los aislamientos de *Staphylococcus* productores de biopelícula (n = 39) fueron polisacáridos en 35 (89.7%) aislamientos, ADN extracelular en 10 (25.6%) aislamientos y proteínas en tres (7.7%) aislamientos (Fig. 1).

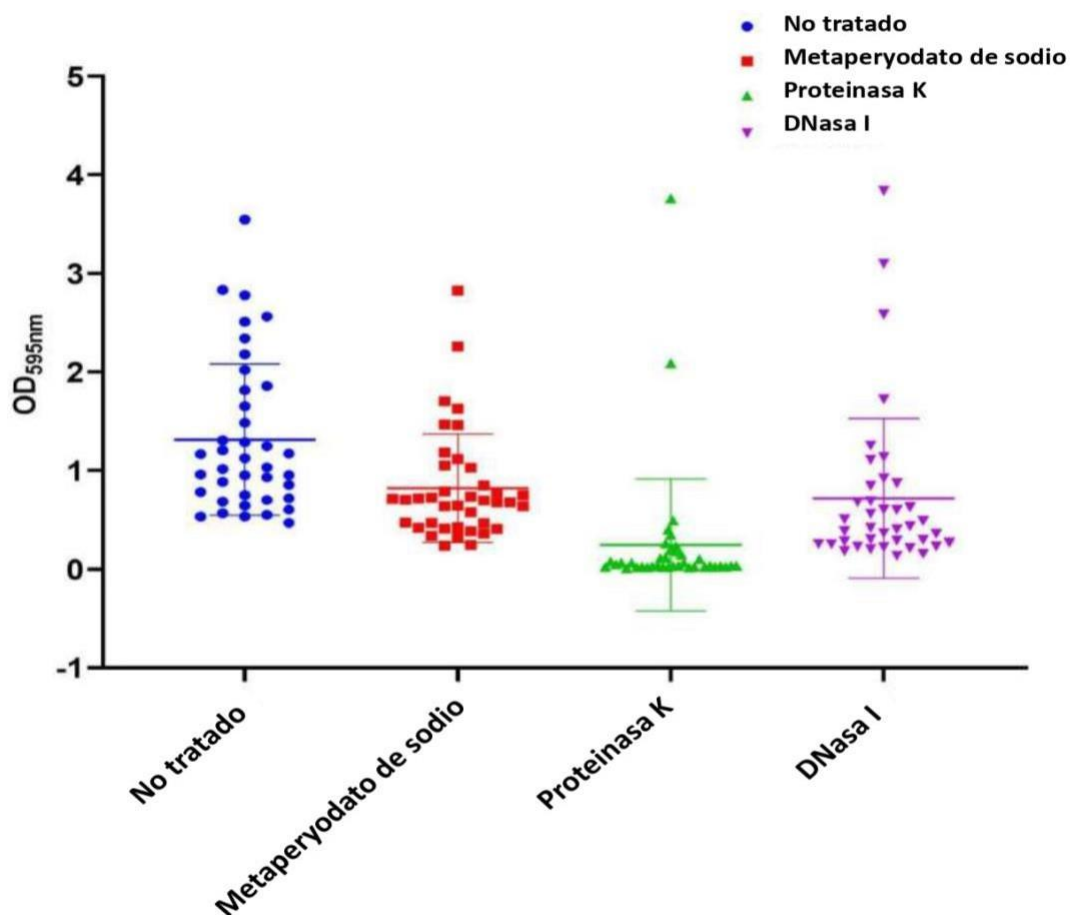


Figura 1. Composición de sustancias poliméricas extracelulares de biopelícula de aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos a partir de infecciones articulares protésicas. La composición de sustancias poliméricas extracelulares de biopelícula de las cepas productoras de biopelícula (36 *S. aureus*, 2 *S. epidermidis* y 1 *S. lugdunensis*) se determinó mediante ensayos de desprendimiento. Las células de biopelícula se trataron con metaperyodato de sodio para degradar los polisacáridos ligados a β -1,6, la proteínasa K para degradar, las proteínas y la DNasa I para degradar el ADN extracelular.

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas y de biopelícula

Las cepas de *Staphylococcus* mostraron tasas moderadas de resistencia a azitromicina (25.6%), oxacilina (23.1%), levofloxacino (23.1%), clindamicina (23.1%), moxifloxacino (17.9%) y trimetoprim-sulfametoxazol (10.3%). Ningún aislamiento fue resistente a doxiciclina, rifampicina o linezolid (Tabla 2).

Se evaluó la susceptibilidad a varios antibióticos en biopelículas bacterianas maduras de 36 cepas de *S. aureus* productoras de biopelículas. En general, los rangos de CMEB fueron mayores que los rangos de MIC para todos los antibióticos estudiados con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). Se comparó la distribución de los valores de CMI y CMEB en aislamientos de *S. aureus* para oxacilina, azitromicina (Fig. 2B), doxiciclina (Fig. 2C), levofloxacino (Fig. 2D), moxifloxacino (Fig. 2E), clindamicina (Fig. 2F), trimetoprim-sulfametoxazol (Fig. 2G), rifampicina (Fig. 2H) y linezolid (Fig. 2I). De acuerdo con estos resultados, en las células planctónicas la mayoría de los aislamientos mostraron susceptibilidad a oxacilina, azitromicina, levofloxacina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y linezolid, mientras que mostraron resistencia a estos antibióticos en las células de biopelícula. En cambio, la mayoría de los aislamientos mostraron susceptibilidad a la rifampicina en células planctónicas y de biopelícula (Fig. 2).

Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Staphylococcus* spp. (n=39).

Agente antimicrobiano	MIC (µg/mL)	Núm. (%) de aislamientos		
	Rango	Susceptible	Intermedio	Resistente
Oxacilina	≤ 0.25 – ≥8	30 (76.9)	NA	9 (23.1)
Azitromicina	≤ 1 – ≥ 16	29 (74.4)	0 (0.0)	10 (25.6)
Doxiciclina	≤ 2	39 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Levofloxacina	≤ 0.25 – ≥ 8	30 (76.9)	0 (0.0)	9 (23.1)
Moxifloxacino	≤ 0.25 – 8	30 (76.9)	2 (5.1)	7 (17.9)
Clindamicina	≤ 0.25 – ≥8	30 (76.9)	0 (0.0)	9 (23.1)
TMP-SXT	≤ 0.25/4.1 – ≥ 8/152	35 (89.7)	NA	4 (10.3)
Rifampicina	≤ 0.25 – 0.25	39 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Linezolid	≤ 0.05–4	39 (100)	NA	0 (0.0)

MIC: concentración mínima inhibitoria; NA: no aplica; TMP-SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol.

Tabla 3. Comparación de la concentración mínima inhibitoria en células planctónicas y concentración mínima de erradicación de biopelícula en células de *S. aureus*.

Cepa	Producción de biopelícula	Perfil de resistencia	Oxacilina (µg/mL)		Azitromicina (µg/mL)		Doxiciclina (µg/mL)		Levofloxacino (µg/mL)		Moxifloxacino (µg/mL)		Clindamicina (µg/mL)		TMP-SXT (µg/mL)		Rifampicina (µg/mL)		Linezolid (µg/mL)	
			MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC
20-0179	Fuerte	SASM	≤ 0.25	512	≤ 1	≥ 512	≤ 2	64	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25	128	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25/4.75	4/76	≤ 0.25	4	2	≥ 128
21-0893	Fuerte	SASM	0.5	8	≤ 1	≤ 4	≤ 2	32	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25/4.75	64/1,216	≤ 0.25	32	2	4
21-1056	Fuerte	SASM	≤ 0.25	64	≤ 1	64	≤ 2	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25	4	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	64/1,216	≤ 0.25	1	4	≥ 128
21-0070	Fuerte	SASM	0.5	64	≤ 1	128	≤ 2	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25	4	≤ 0.25	8	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	2	2	≥ 128
21-1075	Fuerte	SASM	0.5	64	≤ 1	64	≤ 2	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25	1	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	2	2	≥ 128
22-0153	Fuerte	SASM	0.5	32	≤ 1	64	≤ 2	32	≤ 0.25	16	≤ 0.25	0.5	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	1	2	128
21-0550	Fuerte	SASM	0.5	64	≤ 1	128	≤ 2	32	≤ 0.25	16	≤ 0.25	1	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	2	4	≥ 128
21-0066	Fuerte	SASM	1	32	≤ 1	128	≤ 2	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25	8	≤ 0.25	8	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	8	4	128
22-0066	Fuerte	SASM	2	64	≤ 1	64	≤ 2	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25	0.25	≤ 0.25	8	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	2	4	≥ 128
21-0012	Débil	SASM	0.5	32	≤ 1	64	≤ 2	64	≤ 0.25	32	≤ 0.25	8	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	4/76	≤ 0.25	4	2	128
21-0348	Fuerte	SASM	0.5	32	≤ 1	64	≤ 2	32	≤ 0.25	32	≤ 0.25	8	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	2	4	≥ 128
22-0072	Fuerte	SASM	1	64	≤ 1	64	≤ 2	16	≤ 0.25	32	≤ 0.25	2	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	8	2	≥ 128
20-0275	Fuerte	SASM	1	64	≤ 1	128	≤ 2	32	≤ 0.25	32	≤ 0.25	8	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	4/76	≤ 0.25	8	2	≥ 128
20-0755	Fuerte	SASM	1	32	≤ 1	64	≤ 2	≤ 4	≤ 0.25	32	≤ 0.25	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	4	4	≥ 128
20-0106	Fuerte	SASM	1	32	≤ 1	ND	≤ 2	32	≤ 0.25	33	≤ 0.25	4	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	32/608	≤ 0.25	1	2	128
19-2377	Fuerte	SASM	2	≥ 512	≤ 1	≥ 512	≤ 2	32	≤ 0.25	512	≤ 0.25	16	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25/4.75	≥ 64/1,216	≤ 0.25	32	4	≥ 128
21-0891	Fuerte	SASM	≤ 0.25	64	≤ 1	64	≤ 2	16	0.5	64	≤ 0.25	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	1	4	≥ 128
22-0074	Débil	SASM	≤ 0.25	64	≤ 1	64	≤ 2	8	≤ 0.25	8	≤ 0.25	0.25	≤ 0.25	8	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	2	4	≥ 128
21-1080	Fuerte	SASM	≤ 0.25	32	≤ 1	64	≤ 2	8	≤ 0.25	8	≤ 0.25	0.25	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	1	4	≥ 128
21-0633	Débil	SARM	≥ 8	≥ 512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	16	≥ 8	≥ 512	4	≥ 512	≥ 8	≥ 512	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	1	4	≥ 128
21-0725	Débil	SARM	≥ 8	≥ 512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	16	≥ 8	≥ 512	8	≥ 512	≥ 8	≥ 512	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	4	2	128
21-0192	Fuerte	SASM	1	64	≤ 1	64	≤ 2	16	≤ 0.25	32	≤ 0.25	4	≤ 0.25	32	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	2	2	≥ 128
20-0619	Fuerte	SARM	≥ 8	≥ 512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	32	≥ 8	≥ 512	4	64	≥ 8	≥ 512	≤ 0.25/4.75	4/76	≤ 0.25	2	2	≥ 128
21-0380	Débil	SASM	0.5	32	≤ 1	64	≤ 2	16	≤ 0.25	32	≤ 0.25	4	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	1	4	≥ 128
20-0373	Débil	SARM	≥ 8	≥ 512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	16	≥ 8	64	8	8	≥ 8	≥ 512	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	2	2	≥ 128
20-0279	Débil	SARM	≥ 8	512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	16	≥ 8	≥ 512	4	512	≥ 8	≥ 512	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	1	2	≥ 128
22-0214	Fuerte	SASM	≤ 0.25	32	≤ 1	≥ 512	≤ 2	32	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25	256	≤ 0.25	≥ 512	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	1	4	≥ 128
20-0381	Fuerte	SARM	8	128	≥ 16	≥ 512	≤ 2	16	4	≥ 512	1	32	≥ 8	≥ 512	≥ 8/152	≥ 64/1,216	0.25	2	2	≥ 128
21-0233	Débil	SASM	0.5	32	≤ 1	128	≤ 2	8	≤ 0.25	16	≤ 0.25	4	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	2/38	≤ 0.25	0.5	4	≥ 128
20-0504	Fuerte	SASM	0.5	64	≤ 1	128	≤ 2	32	≤ 0.25	32	≤ 0.25	8	≤ 0.25	32	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	2	2	≥ 128
20-0186	Fuerte	SASM	0.5	512	≤ 1	≥ 512	≤ 2	128	≤ 0.25	32	≤ 0.25	16	≤ 0.25	512	≤ 0.25/4.75	≥ 64/1,216	≤ 0.25	64	2	≥ 128
20-0749	Débil	SASM	≤ 0.25	8	≥ 16	≥ 512	≤ 2	32	≤ 0.25	4	≤ 0.25	4	≤ 0.25	16	≤ 0.25/4.75	8/152	≤ 0.25	2	4	≥ 128
21-0486	Fuerte	SASM	0.5	32	≤ 1	64	≤ 2	8	≤ 0.25	64	≤ 0.25	8	≤ 0.25	8	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	1	4	≥ 128
19-2595	Fuerte	SARM	≥ 8	≥ 512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	128	≥ 8	≥ 512	4	≥ 16	≥ 8	≥ 512	≤ 0.25/4.75	≥ 64/1,216	≤ 0.25	8	2	64
20-0622	Débil	SASM	≤ 0.25	128	≤ 1	32	≤ 2	16	≤ 0.25	16	≤ 0.25	2	≤ 0.25	8	≤ 0.25/4.75	16/304	≤ 0.25	0.5	4	≥ 128
20-0080	Fuerte	SARM	≥ 8	512	≥ 16	≥ 512	≤ 2	256	8	32	2	4	≥ 8	≥ 512	≥ 8/152	0.5/9.5	≤ 0.25	1	≤ 0.05	32

MIC: concentración mínima inhibitoria; MBEC: concentración mínima de erradicación de biopelícula; SASM: *Staphylococcus aureus* susceptible a metilicina; SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina; TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; ND: no determinado.

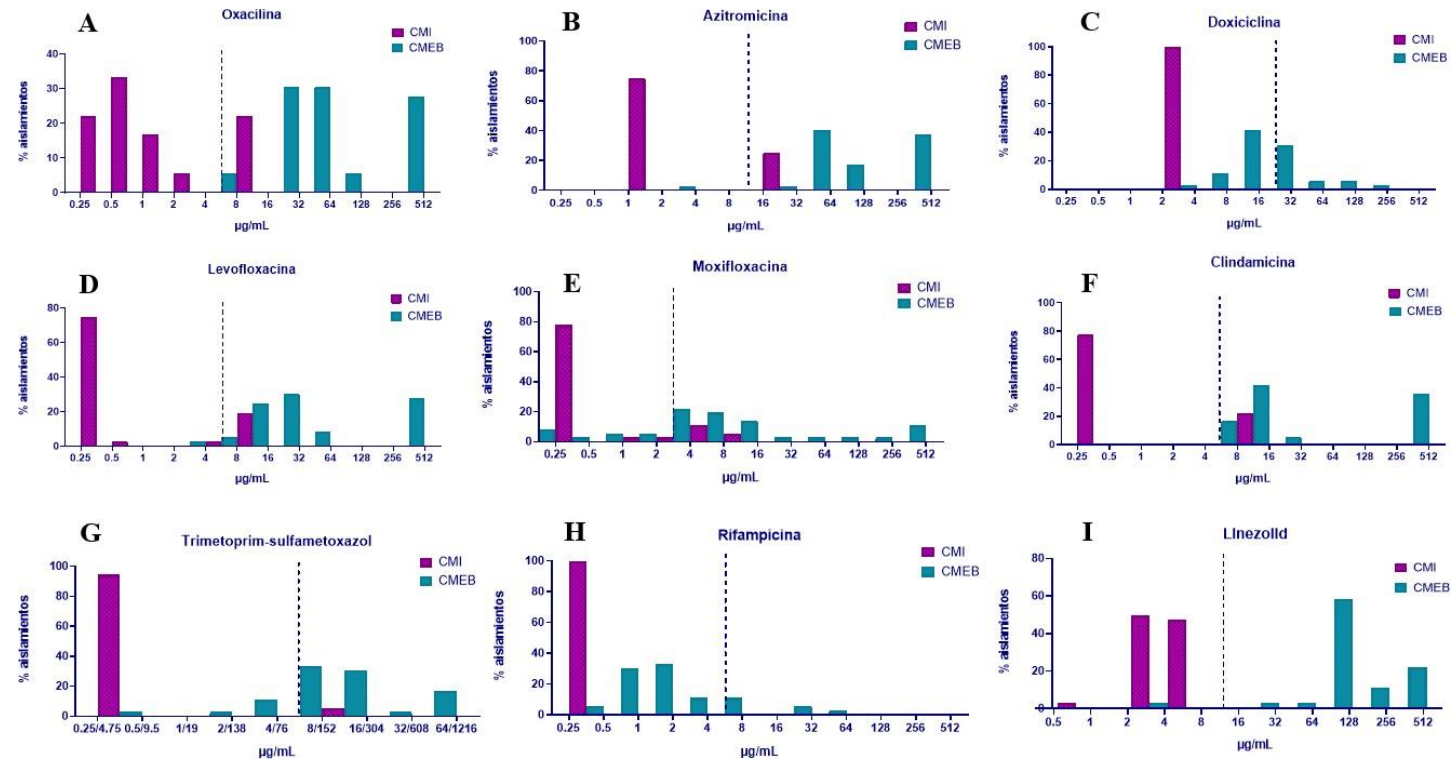


Figura 2. Distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima de Erradicación de Biopelículas (CMEB) en aislamientos de *S. aureus* obtenidos a partir de infecciones articulares protésicas. Se determinó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas y de biopelícula de aislamientos de *S. aureus* productores de biopelícula (n = 36) utilizando el método de microdilución en caldo. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB), y se comparó su distribución utilizando GraphPad versión 8.0. Los antimicrobianos evaluados fueron oxacilina (A), azitromicina (B), doxiciclina (C), levofloxacino (D), moxifloxacina (E), clindamicina (F), trimetoprim-sulfametoxazol (G), rifampicina (H) y linezolid (I). La línea punteada indica la resistencia limítrofe según los criterios establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Erradicación de biopelícula de *S. aureus* con combinaciones de antibióticos

Después de la exposición con concentraciones limítrofes de dos antibióticos (doxiciclina [4 µg/mL], moxifloxacino [0.5 µg/mL] y/o rifampicina [1 µg/mL]), se evaluó la erradicación de la biopelícula (Tabla 4). Se observó la erradicación total de la biopelícula en 13 (36.1%) aislamientos de *S. aureus* (siete SASM y seis SARM; siete productores de biopelícula fuerte y seis débiles) y la erradicación parcial de la biopelícula en cuatro aislamientos (11.1%) después del tratamiento combinado con rifampicina y moxifloxacino. En otros 12 (33.3%) aislamientos (siete SASM y cinco SARM; siete productores de biopelícula fuerte y cinco débiles), el tratamiento combinado de rifampicina y doxiciclina provocó la erradicación total de la biopelícula. También se observó una erradicación parcial de la biopelícula en dos aislamientos (5.6%) después del tratamiento combinado con rifampicina y doxiciclina. La exposición de la combinación de doxiciclina y moxifloxacino provocó la erradicación total de la biopelícula solo en tres aislamientos (8.3%; dos SARM y un SASM; dos productores de biopelícula fuerte y uno débil).

Tabla 4. Erradicación de biopelícula en aislamientos de *S. aureus* con combinación de antibióticos.
Se expusieron combinaciones de concentraciones de doxiciclina (4 µg/mL), moxifloxacino (0,5 µg/mL) y rifampicina (1 µg/mL) a biopelículas maduras y se evaluó la erradicación de biopelículas.

Cepa	Producción de biopelícula	Perfil de resistencia	CMEB (µg/mL)			Erradicación de biopelícula		
			DOX	MOX	RIF	RIF/MOX	RIF/DOX	DOX/MOX
20-0179	Fuerte	SASM	64	128	4	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0893	Fuerte	SASM	32	≥ 512	32	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-1056	Fuerte	SASM	16	4	1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0070	Fuerte	SASM	16	4	2	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-1075	Fuerte	SASM	16	1	2	Ninguna	Ninguna	Ninguna
22-0153	Fuerte	SASM	32	0.5	1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0550	Fuerte	SASM	32	1	2	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0066	Fuerte	SASM	16	8	8	Ninguna	Ninguna	Ninguna
22-0066	Fuerte	SASM	16	0.25	2	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0012	Débil	SASM	64	8	4	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0348	Fuerte	SASM	32	8	2	Ninguna	Ninguna	Ninguna
22-0072	Fuerte	SASM	16	2	8	Ninguna	Ninguna	Ninguna
20-0275	Fuerte	SASM	32	8	8	Ninguna	Ninguna	Ninguna
20-0755	Fuerte	SASM	≤4	16	4	Ninguna	Ninguna	Ninguna
20-0106	Fuerte	SASM	32	4	1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
19-2377	Fuerte	SASM	32	16	32	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0891	Fuerte	SASM	16	16	1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
22-0074	Débil	SASM	8	0.25	2	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-1080	Fuerte	SASM	8	0.25	1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
21-0633	Débil	SARM	16	≥ 512	1	Total	Ninguna	Ninguna
21-0725	Débil	SARM	16	≥ 512	4	Total	Ninguna	Ninguna
21-0192	Fuerte	SASM	16	4	2	Parcial	Ninguna	Ninguna
20-0619	Fuerte	SARM	32	64	2	Parcial	Parcial	Ninguna
21-0380	Débil	SASM	16	4	1	Parcial	Parcial	Ninguna
20-0373	Débil	SARM	16	8	2	Parcial	Total	Ninguna
20-0279	Débil	SARM	16	512	1	Total	Total	Ninguna
22-0214	Fuerte	SASM	32	256	1	Total	Total	Ninguna
20-0381	Fuerte	SARM	16	32	2	Total	Total	Ninguna
21-0233	Débil	SASM	8	4	0.5	Total	Total	Ninguna
20-0504	Fuerte	SASM	32	8	2	Total	Total	Ninguna
20-0186	Fuerte	SASM	128	16	64	Total	Total	Ninguna
20-0749	Débil	SASM	32	4	2	Total	Total	Ninguna
21-0486	Fuerte	SASM	8	8	1	Total	Total	Ninguna
19-2595	Fuerte	SARM	128	≥ 16	8	Total	Total	Total
20-0622	Débil	SASM	16	2	0.5	Total	Total	Total
20-0080	Fuerte	SARM	256	4	1	Total	Total	Total

DOX: doxiciclina; MBEC: concentración mínima de erradicación de biopelícula; SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina; SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; MOX: moxifloxacino; RIF: rifampicina.

DISCUSIÓN

El tratamiento de la osteomielitis y las infecciones por dispositivos ortopédicos sigue siendo complejo. Se requieren altas concentraciones de antibióticos para poder penetrar en el hueso lo suficiente como para reducir la supervivencia bacteriana y aún existe la posibilidad de que no se puedan erradicar las biopelículas bacterianas (Sweeney *et al.* 2019). El estudio OVIVA, que comparó el cambio temprano de antibióticos intravenosos a orales contra el mantenimiento de la terapia intravenosa durante al menos seis semanas en adultos con infección ósea y articular, utilizó penicilinas orales, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, lincosamida y otros antibióticos VO únicos o combinados (Li *et al.* 2019). Si bien ha traído un nuevo revuelo con respecto a las terapias orales, los datos con un nivel de evidencia lo suficientemente fuerte para un medicamento o medicamentos en particular siguen siendo difíciles de alcanzar.

Sumado a esto, la extracción de dispositivos ortopédicos no siempre es factible o buscada activamente por los equipos quirúrgicos y persisten las superficies abióticas donde podría desarrollarse biopelícula (Shoji and Chen 2020). Con respecto a OVIVA, casi una cuarta parte de los participantes tenían su implante retenido (Li *et al.* 2019). Esto refleja una realidad con la que los tratantes de enfermedades infecciosas deben lidiar, una realidad en la que el uso de antibióticos orales no debe ser excluido con la finalidad de tratar de disminuir las infecciones adquiridas en el hospital y los costos monetarios.

En nuestro estudio, empleamos el uso del dispositivo de biopelícula Calgary, uno de los modelos de biopelícula *in vitro* más utilizados para evaluar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, que se basa en la sonicación para liberar células viables de biopelícula (Ceri *et al.* 1999; Chen *et al.* 2020). Nuestros hallazgos mostraron que, en cuanto a las

infecciones óseas y de implantes ortopédicos, la gran mayoría de las cepas de *S. aureus* producían biopelícula en mayor o menor medida. Si bien las cepas que encontramos y estudiamos no tenían una alta resistencia a los antibióticos probados, la comparación entre los valores de CMI y CMEB proporciona un panorama sombrío. Los valores de CMEB de azitromicina, levofloxacino, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y linezolid superan los valores límite de CMI para la resistencia en casi todas las cepas. Este fenómeno ya se ha sido descrito previamente (Li *et al.* 2022; Mandell *et al.* 2019; Molina-Manso *et al.* 2013).

La rifampicina mostró una alta efectividad contra las células planctónicas y de biopelícula, siendo capaz de erradicar biopelículas maduras en la mayoría de las cepas de *S. aureus* a bajas concentraciones. De hecho, la rifampicina se utiliza en la terapia combinada en infecciones relacionadas con dispositivos ortopédicos (Zimmerli and Sendi 2019). Se debe tener cuidado al analizar y aplicar estos datos, ya que se han visto efectos antagónicos en otros estudios (Daffinee *et al.* 2023; Dall *et al.* 2018; LaPlante and Woodmansee 2009) cuando la rifampicina se ha combinado con gentamicina, vancomicina o daptomicina (que no fueron estudiadas por nosotros debido a su vía de administración). Sin embargo, uno de estos estudios también encontró un efecto sinérgico de la rifampicina con una fluoroquinolona (Daffinee *et al.* 2023).

Además, exploramos si las cepas de diferentes sitios clínicos tenían diferencias en la composición de su biopelícula y si dicha composición afecta la actividad antimicrobiana sobre las biopelículas. En nuestro estudio, los principales componentes de biopelícula de las cepas de *S. aureus* fueron los polisacáridos (89.7%) frente al ADN extracelular (25.6%) y las proteínas (7.7%). Otros estudios muestran que la biopelícula de *S. aureus* está compuesto principalmente por ADN extracelular como componente estructural principal de la biopelícula, mientras que los exopolisacáridos, como el polisacárido de adhesina intercelular

(PIA) y la β -1,6 poli-N-acetilglucosamina (PNAG) son componentes menores de la biopelícula (Izano *et al.* 2008; Kranjec *et al.* 2021). En cepas de *S. aureus* aisladas de materiales implantados óseos, articulares y osteoarticulares, el PNAG contribuyó a la formación de biopelículas en mayor proporción que el ADN extracelular.

Dada la complejidad de la erradicación de biopelículas, la terapia combinada se ha propuesto durante mucho tiempo como una herramienta (Lamret *et al.* 2020; Shoji and Chen 2020). Por lo tanto, elegimos los tres antibióticos con la mayor cantidad de cepas que mostraban un CMEB por debajo del límite de resistencia a la CMI y probamos las combinaciones solo con una combinación conocida. Si bien este enfoque no es típico, proponemos este método para buscar su aplicación dentro de la práctica clínica, dado que la mayoría de los resultados de los ensayos de sinergia de biopelículas no se aplican a las decisiones de tratamiento. Está por verse si esto tendrá un impacto en los resultados de la cura.

Cuando se combinaron en concentraciones susceptibles limítrofes, el moxifloxacino-rifampicina y la doxiciclina-rifampicina fueron capaces de erradicar las biopelículas en un tercio de las cepas, mientras que la combinación de doxiciclina-moxifloxacino demostró ser ineficaz para erradicar la biopelícula, inhibiéndola solo en tres cepas. Por lo tanto, nuestros datos proporcionaron dos posibles combinaciones contra biopelículas. En un estudio anterior, la rifampicina y la doxiciclina fueron los antibióticos más eficaces contra las biopelículas establecidas de *S. aureus* (Mandell *et al.* 2019).

Si bien se ha demostrado un efecto sinérgico *in vitro* con la rifampicina, es importante señalar que su administración concomitante disminuye los niveles tanto de doxiciclina como de moxifloxacino (Colmenero *et al.* 1994; Solera and Solís García Del Pozo 2017; Vogensen *et al.* 2022). Este hecho no se traduce necesariamente en fracaso clínico ya que las

combinaciones han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de la brucelosis y la tuberculosis farmacorresistente, respectivamente (Colmenero *et al.* 1994; Solera and Solís García Del Pozo 2017; Vogensen *et al.* 2022), pero puede significar que podría ser necesario aumentar la dosis para los dos últimos, a pesar de las excelentes concentraciones óseas de los tres fármacos (Thabit *et al.* 2019).

Cuatro limitaciones importantes deben abordarse a la hora de analizar nuestros datos. En primer lugar, hemos diferenciado las cepas según su origen en función de si se obtuvieron a partir de muestras óseas o protésicas, pero aún no está definido si existe una diferencia en los resultados clínicos de las infecciones asociadas a biopelícula en estas dos superficies tan diferentes. En segundo lugar, los escenarios clínicos de los que se han obtenido muestras son heterogéneos e incluyen sonicación de material procedente de artritis séptica o abscesos vertebrales que podrían debatirse si se trata de infecciones asociadas a biopelículas. En tercer lugar, los datos mostrados a partir de la comparación de CMI en células planctónicas y CMEB en células de biopelícula de *S. aureus* no correlacionaron la CMEB estimada, y la capacidad de producción de biopelículas de los aislamientos y, en consecuencia, la resistencia a los antimicrobianos está seguramente mediada por factores distintos de la producción de biopelículas. En cuarto lugar, nuestros métodos no tuvieron en cuenta las bacterias viables, pero no cultivables, y estas células podrían, potencialmente, dentro de ciertas condiciones, revertir su estado y alterar los resultados obtenidos. Por lo tanto, el campo aún no ha respondido a preguntas complicadas para las que todavía tenemos respuestas limitadas.

CONCLUSIÓN

En conclusión, proponemos el estudio y uso de rifampicina en combinación con moxifloxacino o doxiciclina para el diseño de ensayos clínicos de infección ósea y/o de dispositivos ortopédicos sin desbridamiento adecuado ni retención de material. Además, sugerimos la posibilidad de utilizar una combinación de concentraciones de antibióticos susceptibles limítrofes con el dispositivo MBEC Calgary para buscar combinaciones clínicamente relevantes que puedan aplicarse a la toma de decisiones clínicas en lugar de modelos más complejos que puedan ser más adecuados para la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Arciola, C. R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018), 'Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion', *Nat Rev Microbiol*, 16 (7), 397-409.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., and Buret, A. (1999), 'The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms', *J Clin Microbiol*, 37 (6), 1771-6.
- Chen, Xiaofeng, Thomsen, Trine Rolighed, Winkler, Heinz, and Xu, Yijuan (2020), 'Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal in vitro', *BMC Microbiology*, 20 (1), 264.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., and Beachey, E. H. (1985), 'Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices', *J Clin Microbiol*, 22 (6), 996-1006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2022), 'M100. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 32nd', (Clinical and Laboratory Standards Institute).
- Colmenero, J D, Fernández-Gallardo, L C, Agúndez, J A, Sedeño, J, Benítez, J, and Valverde, E (1994), 'Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis', *Antimicrob Agents Chemother*, 38 (12), 2798-802.

- Conterno, L. O. and Turchi, M. D. (2013), 'Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults', *Cochrane Database Syst Rev*, (9), Cd004439.
- Daffinee, K. E., Piehl, E. C., Bleick, C., and LaPlante, K. L. (2023), 'Eradication of *Staphylococcus epidermidis* within Biofilms: Comparison of Systemic versus Supratherapeutic Concentrations of Antibiotics', *67* (6), e00108-23.
- Dall, G F, Tsang, S-T J, Gwynne, P J, MacKenzie, S P, Simpson, A H R W, Breusch, S J, and Gallagher, M P (2018), 'Unexpected synergistic and antagonistic antibiotic activity against *Staphylococcus* biofilms', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73* (7), 1830-40.
- Izano, Era A., Amarante, Matthew A., Kher, William B., and Kaplan, Jeffrey B. (2008), 'Differential Roles of PolyN-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms', *Appl Environ Microbiol*, *74* (2), 470-76.
- Kapadia, B. H., Berg, R. A., Daley, J. A., Fritz, J., Bhave, A., and Mont, M. A. (2016), 'Periprosthetic joint infection', *Lancet*, *387* (10016), 386-94.
- Kavanagh, N., Ryan, E. J., Widaa, A., Sexton, G., Fennell, J., O'Rourke, S., Cahill, K. C., Kearney, C. J., O'Brien, F. J., and Kerrigan, S. W. (2018), 'Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions', *Clin Microbiol Rev*, *31* (2).
- Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Marli, M., Fernandez, L., Garcia, P., Kjos, M., and Diep, D. B. (2021), 'Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives', *Antibiotics (Basel)*, *10* (2).

- Lamret, F., Colin, M., Mongaret, C., Gangloff, S. C., and Reffuveille, F. (2020), 'Antibiotic Tolerance of Staphylococcus aureus Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies', *Antibiotics (Basel)*, 9 (9).
- LaPlante, Kerry L. and Woodmansee, Suzanne (2009), 'Activities of Daptomycin and Vancomycin Alone and in Combination with Rifampin and Gentamicin against Biofilm-Forming Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in an Experimental Model of Endocarditis', 53 (9), 3880-86.
- Li, H. K., Rombach, I., Zambellas, R., Walker, A. S., McNally, M. A., Atkins, B. L., Lipsky, B. A., Hughes, H. C., Bose, D., Kümin, M., Scarborough, C., Matthews, P. C., Brent, A. J., Lomas, J., Gundle, R., Rogers, M., Taylor, A., Angus, B., Byren, I., Berendt, A. R., Warren, S., Fitzgerald, F. E., Mack, D. J. F., Hopkins, S., Folb, J., Reynolds, H. E., Moore, E., Marshall, J., Jenkins, N., Moran, C. E., Woodhouse, A. F., Stafford, S., Seaton, R. A., Vallance, C., Hemsley, C. J., Bisnauthsing, K., Sandoe, J. A. T., Aggarwal, I., Ellis, S. C., Bunn, D. J., Sutherland, R. K., Barlow, G., Cooper, C., Geue, C., McMeekin, N., Briggs, A. H., Sendi, P., Khatamzas, E., Wangrangsimakul, T., Wong, T. H. N., Barrett, L. K., Alvand, A., Old, C. F., Bostock, J., Paul, J., Cooke, G., Thwaites, G. E., Bejon, P., and Scarborough, M. (2019), 'Oral versus Intravenous Antibiotics for Bone and Joint Infection', *N Engl J Med*, 380 (5), 425-36.
- Li, J., Cheung, W. H., Chow, S. K., Ip, M., Leung, S. Y. S., and Wong, R. M. Y. (2022), 'Current therapeutic interventions combating biofilm-related infections in orthopaedics : a systematic review of in vivo animal studies', *Bone Joint Res*, 11 (10), 700-14.

- Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C. A., Ball, A. R., Magiorkinis, E., Chatzipanagiotou, S., Hamblin, M. R., Hadjifrangiskou, M., and Tegos, G. P. (2018), 'Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms', *Clin Microbiol Rev*, 31 (3).
- Mandell, Jonathan B., Orr, Sara, Koch, John, Nourie, Blake, Ma, Dongzhu, Bonar, Daniel D., Shah, Neel, and Urish, Kenneth L. (2019), 'Large variations in clinical antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms of periprosthetic joint infection isolates', *J Orthop Res*, 37 (7), 1604-09.
- Mendoza-Olazarán, S., Morfín-Otero, R., Villarreal-Treviño, L., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Camacho-Ortiz, A., González, G. M., Casillas-Vega, N., and Garza-González, E. (2015), 'Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood', *PLoS One*, 10 (12), e0144684.
- Molina-Manso, D., del Prado, G., Ortiz-Pérez, A., Manrubia-Cobo, M., Gómez-Barrena, E., Cordero-Ampuero, J., and Esteban, J. (2013), 'In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections', *Int J Antimicrob Agents*, 41 (6), 521-3.
- Morgenstern, M., Erichsen, C., von Rüden, C., Metsemakers, W. J., Kates, S. L., Moriarty, T. F., and Hungerer, S. (2016), 'Staphylococcal orthopaedic device-related infections in older patients', *Injury*, 47 (7), 1427-34.
- Osmon, D. R., Berbari, E. F., Berendt, A. R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J. M., Rao, N., Hanssen, A., and Wilson, W. R. (2013), 'Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America', *Clin Infect Dis*, 56 (1), e1-e25.

- Sabaté Brescó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., Richards, R. G., and Moriarty, T. F. (2017), 'Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection', *Front Microbiol*, 8, 1401.
- Seaton, R. A., Ritchie, N. D., Robb, F., Stewart, L., White, B., and Vallance, C. (2019), 'From 'OPAT' to 'COpAT': implications of the OVIVA study for ambulatory management of bone and joint infection', *J Antimicrob Chemother*, 74 (8), 2119-21.
- Shoji, M. M. and Chen, A. F. (2020), 'Biofilms in Periprosthetic Joint Infections: A Review of Diagnostic Modalities, Current Treatments, and Future Directions', *J Knee Surg*, 33 (2), 119-31.
- Solera, J. and Solís García Del Pozo, J. (2017), 'Treatment of pulmonary brucellosis: a systematic review', *Expert Rev Anti Infect Ther*, 15 (1), 33-42.
- Sweeney, E., Lovering, A. M., Bowker, K. E., MacGowan, A. P., and Nelson, S. M. (2019), 'An in vitro biofilm model of Staphylococcus aureus infection of bone', *Lett Appl Microbiol*, 68 (4), 294-302.
- Thabit, Abrar K., Fatani, Dania F., Bamakhrama, Maryam S., Barnawi, Ola A., Basudan, Lana O., and Alhejaili, Shahad F. (2019), 'Antibiotic penetration into bone and joints: An updated review', *International Journal of Infectious Diseases*, 81, 128-36.
- Vogensen, V. B., Bolhuis, M. S., Sturkenboom, M. G. G., van der Werf, T. S., de Lange, W. C. M., Anthony, R. M., van Soolingen, D., Alffenaar, J. W., Kerstjens, H. A. M., and Akkerman, O. W. (2022), 'Clinical Relevance of Rifampicin-

Moxifloxacin Interaction in Isoniazid-Resistant/Intolerant Tuberculosis Patients',
Antimicrob Agents Chemother, 66 (2), e0182921.

Weber, Amy L. (2016), 'Wound Cultures', *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3.13.1.1-3.13.2.4.

Zhu, W., Sieradzki, K., Albrecht, V., McAllister, S., Lin, W., Stuchlik, O., Limbago, B., Pohl, J., and Kamile Rasheed, J. (2015), 'Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of Staphylococcus species', *J Microbiol Methods*, 117, 14-7.

Zimmerli, W. and Sendi, P. (2019), 'Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections In Vitro, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections', *Antimicrob Agents Chemother*, 63 (2).

