

Biofilm: ¿amenaza latente o factor de protección? Estado del arte

Juan Bernardo Bruce Diemond Hernández,¹
Guadalupe Miranda Novales.²

Biofilm: Latent Threat or Protective Factor? State of Art

Fecha de aceptación: noviembre 2007

Resumen

Dentro del estudio de la patogenia de los *Staphylococcus*, el biofilm como factor de virulencia ha recibido gran atención en los últimos años, debido a la elevada incidencia de infecciones relacionadas a dispositivos plásticos, al incremento en los costos de la atención y el aumento del riesgo de complicaciones en estos pacientes, lo cual se atribuye a una respuesta inadecuada al tratamiento antimicrobiano ante la presencia de biofilm.

Actualmente, se ha caracterizado la estructura molecular del biofilm, los genes que codifican la información para su expresión, los genes responsables de su regulación, los químicos que lo inducen y su interacción *in vitro* con los mecanismos de defensa del cuerpo y con los antimicrobianos. Sin embargo, aún no se determina su importancia en la clínica y los efectos pronósticos sobre la respuesta terapéutica y la persistencia y uso del dispositivo plástico.

Se revisó la literatura sobre este tema, se exponen los resultados descritos en algunos estudios y se comparan con los obtenidos con *Staphylococcus spp.* aislados de pacientes pediátricos.

Palabras clave: *Biofilm, slime, Staphylococcus, infección de dispositivos plásticos.*

Abstract

The study of the pathogenesis of *Staphylococcus*, includes biofilm as a virulence factor. It has received great interest in recent years, mainly related to the high frequency of infections associated to plastic devices, the high costs of the infections, and the elevated risk of complications in these patients, in part attributed to a bad therapeutic response in the presence of biofilm.

The molecular structure of biofilm has been described, along with the pathway of production, the responsible genes involved in its expression and the mechanisms of regulation. Some studies include induction by chemicals and *in vitro* interactions with the mechanisms of defense of the host and antimicrobials. Despite the number of publications; the clinical relevance and the prognostic implications regarding the response to treatment and its role in the adherence to the plastic device remains to be defined.

We performed a review of the literature, analyze the results of published studies and compared them with our assays with *Staphylococcus spp.* isolated from pediatric patients.

Keywords: *Biofilm, slime, Staphylococcus, plastic devices associated infections.*

1. Servicio de Infectología, Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

2. Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Durante su evolución, las bacterias han modificado constantemente su metabolismo y características físicas, adaptándose prácticamente a todos los ambientes del planeta.^{1,2}

Así, tenemos bacterias capaces de sobrevivir en candentes géiseres de origen volcánico o en suspensiones hiperosmolares extremas de algunos lagos, o a grandes profundidades marinas, donde se adaptan perfectamente. Además, se encuentran prácticamente en cualquier parte: en suelos, agua, y en los seres vivos, en simbiosis permanente.^{1,2}

A diferencia de lo que se piensa comúnmente, son pocas las bacterias con capacidad de producir enfermedad en los seres humanos, y si tomamos en cuenta que la gran mayoría se comportan como patógenas –no por modificaciones inherentes al microorganismo, sino por alteraciones en los mecanismos de defensa de las personas–, el número de microorganismos capaces de causar enfermedad es aún menor.

El biofilm es una población bacteriana (generalmente una clona), envuelta por una matriz glucoprotéica, que tiene la capacidad de adherirse a superficies, interfases u otras. Estas colonias son semejantes a las observadas en los hongos, en las que el micelio forma una intrincada red en constante comunicación entre sí y con el medio externo. Se puede observar que en el biofilm hay microcolonias rodeadas de canales llenos de agua, y su función es semejante a la de un sistema circulatorio primitivo, permitiendo el acceso de nutrientes, la eliminación de desechos y la comunicación con otras microcolonias.^{1,4}

Esta matriz glucoprotéica no sólo permite el intercambio de metabolitos entre microcolonias y el exterior, sino que además les confiere una barrera protectora contra ambientes adversos, como falta de nutrientes, medio hiperosmolar, anaerobiosis, presencia de anticuerpos, macrófagos y antibióticos. Sin embargo, las bacterias sacrifican su capacidad de crecimiento y desplazamiento dentro del biofilm.^{1,5}

El biofilm es responsable de la formación de las placas de sarro, de la suciedad de los tanques de almacenamiento y de atascar las tuberías de las casas.^{1,2,6}

Varias son las bacterias capaces de formar biofilm, tanto gram positivas como gram negativas, así como también patógenas y no patógenas (Cuadro I).^{1,2,6}

Cuadro I
Bacterias de interés médico con la capacidad de producir biofilm

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus sp</i>
<i>Streptococcus mutans</i>

El interés emergente para la medicina es la observación de que las bacterias patógenas se adhieren a dispositivos plásticos (prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas artificiales, marcapasos, lentes de contacto, injertos plásticos y dispositivos intravenosos temporales o permanentes). Una vez adheridas, comienzan a formar el biofilm, que impide la acción no sólo de fagocitos y anticuerpos que tratan de eliminarlos, sino además de antibióticos indicados como tratamiento. Se ha encontrado que al obtener cultivos de estas bacterias, son sensibles *in vitro* a los tratamientos convencionales; sin embargo, las grandes moléculas de antibióticos no logran atravesar la estrecha red de glucoproteínas del biofilm para llegar a su sitio de acción.^{5,6,8,9}

Por tanto, el biofilm le otorga a las microcolonias un mecanismo de resistencia diferente a los habitualmente descritos (que son de índole bioquímica), siendo extremadamente efectivo; confiriéndole a las bacterias una resistencia de hasta unas 500 veces más de lo habitual.^{1,4,8-11}

Una de estas bacterias –que más se estudia en el mundo actualmente por su capacidad de producir biofilm y ser causa de múltiples enfermedades– es el *Staphylococcus epidermidis* y otras del género *Staphylococcus*, incluyendo *aureus*.

Los *Staphylococcus* son un género de la familia de los *Micrococcaceae*, junto con *Micrococcus* y *Planococcus*. El *Staphylococcus aureus* fue descrito como patógeno entre 1880 y 1882 por Ogston,³ y posteriormente identificado como coco gram positivo que se ordena en tétradas (de ahí su nombre: racimos de uvas). Se caracteriza por su alto contenido de peptidoglucano y bajo contenido lipídico en su pared celular.^{1,3}

Los *Staphylococcus* son generalmente inoos en condiciones normales. Sin embargo, al perderse la continuidad de piel o mucosas, rompiéndose las barreras naturales de defensa del organismo, se favorece la invasión bacteriana y en consecuencia el riesgo de desarrollar infecciones, como celulitis, abscesos, bacteriemia e incluso choque séptico. Los *Staphylococcus* son capaces de producir infección en cualquier lugar del organismo, que en pacientes con alteraciones inmunológicas o enfermedades debilitantes pueden ser mortales.^{1, 3, 4, 7, 9-11}

Fue a principios de 1972 cuando Baysston y Penny notaron que los *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCN), aislados de sistemas de derivación ventriculo-peritoneal, elaboraban un material mucoide, probablemente un polisacárido.¹² Posteriormente otros estudios mostraron que los SCN aislados de infecciones de dispositivos plásticos producían esta sustancia a la que se le denominó *slime* (limo) y que los SCN aislados de piel no la producían.^{11, 13, 14, 15, 16}

Esto llamó la atención de diversos grupos de investigadores que buscaron, en primera instancia, determinar la estructura bioquímica de este slime, encontrando que se trataba de un polímero al que se denominó *adhesina*, que semeja a la estructura de la celulosa; esto predice un polímero con forma menos compacta y más flexible. La arquitectura no enlazada puede proporcionar los contactos y las interacciones de largo alcance entre la pared de las bacterias, a semejanza de la lectina en la superficie de las células animales.^{5, 9, 13, 14, 18}

Junto a la investigación de la estructura molecular del slime, también se desarrollaron varias técnicas para identificar a las bacterias productoras de biofilm; una de estas técnicas, muy difundida por su sencillez y bajo costo es la siembra de la colonia sospechosa en agar de rojo Congo, en donde las colonias productoras toman un color negro opaco y las negativas un color rojo-rosa brillante; incluso se puede percibir una modificación en su morfología, encontrando a las colonias positivas firmemente adheridas al agar y las negativas tienen una consistencia laxa.¹⁹ Otra manera de determinar la presencia o no de slime es el método de fotodensitometría en cultivos de caldo teñidos con safranina, descrito en la década de 1980, el cual tiene la ventaja de ser más exacto al proporcionar un valor cuantitativo sobre la producción de slime; sin embargo, es más costoso y laborioso en su realización.²⁰

Posteriormente se detectaron los genes encargados de codificar las enzimas que sintetizan las glucoproteínas del slime.^{21, 22}

Actualmente se busca determinar la importancia del biofilm en la virulencia y patogenicidad de los *Staphylococcus*, para proponer mejores alternativas de manejo en caso de que esté presente. Existe evidencia de que diversos factores inducen la formación de biofilm en cepas de *Staphylococcus*, como la presencia de aminos vasoactivas, condiciones de anaerobiosis, incremento en la concentración de azúcares como glucosa, y diversas concentraciones de antibióticos, realizados todos ellos en cepas sobre placas de agar.²³⁻²⁷

Actualmente se sugiere que el biofilm tiene un papel fundamental en la virulencia de los *Staphylococcus*. En este género, el biofilm se forma en dos fases: la primera, o de ataque inicial rápido a la superficie polimérica, tiene una adherencia reversible a la superficie de contacto. Existen varios factores involucrados en esta adherencia inicial, como la hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares; la segunda, de multiplicación celular y producción del polisacárido de adherencia intercelular (PIA), que implica la adhesión entre bacterias, da como resultado la formación de una microcolonia y la compleja arquitectura del biofilm.^{6, 8, 11, 18}

La primera fase

Después de que las bacterias se han adherido a la superficie, gracias a las adhesinas de superficie, éstas se multiplican y forman microcolonias; sin embargo, la unión entre ellas y la superficie es laxa y poco organizada, por lo que requieren de adherencia intercelular. Las adhesinas están formadas por proteínas de membrana codificadas por genes específicos del cromosoma bacteriano, entre los que destacan el *atlE*, que ha sido identificado como parte de los primeros pasos en la formación del biofilm. La arquitectura no enlazada puede proporcionar los contactos y las interacciones de largo alcance entre la pared de las bacterias.^{29, 30}

Muchas proteínas superficiales se han identificado como causales de la capacidad de adherencia a las superficies plásticas. Se ha descrito que las adhesinas semejantes a las fimbrias SSP-1 y SSP-2 contribuyen a la adhesión al plástico.^{8, 11, 29, 30}

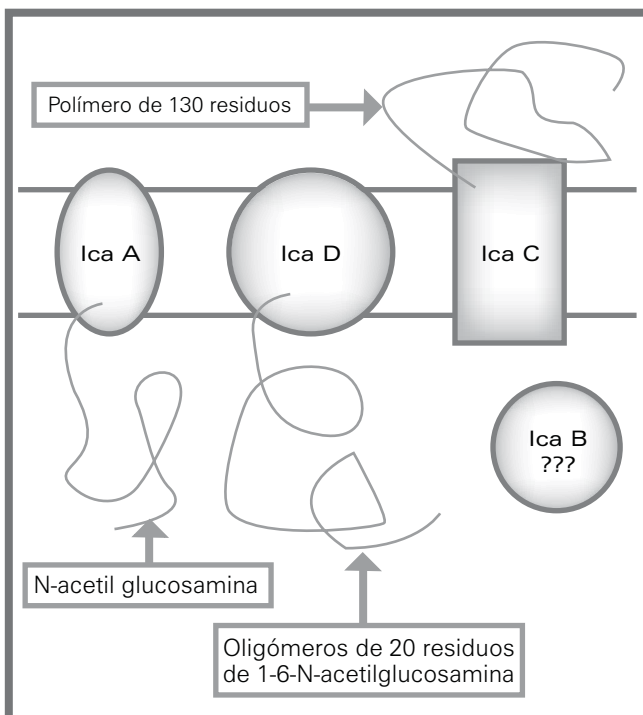
La segunda fase

La segunda fase inicia la producción del polisacárido de adherencia intercelular; una vez que las bacterias están adheridas a una superficie, éstas se multiplican y forman microcolonias con estructuras que incrementan paulatinamente su organización en forma de mosaicos, llegando a alcanzar una alta organización que requiere de adherencia intercelular.

El polisacárido de adherencia intercelular (PIA) es un polímero de glucosamina con una estructura bioquímica de β -1, 6-N-acetil-glucosamina.^{8, 11, 18} La producción del PIA se debe a la acción de una compleja cadena de enzimas, aún no identificadas por completo, codificadas por una región constante del genoma bacteriano de los *Staphylococcus*, organizado en un operón del grupo de adhesinas intercelulares (ICA, por sus siglas en inglés: Intercellular Cluster Adhesin) (Figura 1).^{8, 11}

Figura 1. Modelo hipotético de la síntesis de PIA. Las enzimas codificadas por los genes *Ica A* e *Ica D* forman oligómeros dentro de la célula bacteriana. La enzima *Ica C* une a esos oligómeros en grandes polímeros entrelazados y los moviliza al exterior celular. La enzima del *Ica B* podría catalizar una reacción de acetilación que estabiliza la molécula.^{8, 14}

Figura 1



El operón de *Ica* está constituido por un componente operador *IcaR* y un grupo estructural de cuatro genes, *Ica A*, *Ica B*, *Ica C* e *Ica D*. Estos genes del operón de *Ica* fueron descritos por primera vez en 1996.³²

En todos los microorganismos la expresión génica está controlada por una gran variedad de mecanismos. Las células procariotas por lo general regulan la cantidad y la actividad de las enzimas que participan en una vía metabólica específica a través de sustratos inductores o de productos finales represores. Los inductores y represores actúan en genes reguladores, controlando el inicio de la transcripción de un grupo pequeño de genes estructurales que intervienen en una misma vía metabólica. El conjunto de genes estructurales y reguladores constituye un operón. Los genes reguladores están formados por una secuencia que codifica para una proteína represora o represor, cuya función consiste en bloquear la expresión génica cuando se une a un sitio específico en el ADN que recibe el nombre de *operador*; además, cada operón tiene al menos un promotor, que actúa como sitio de unión de la RNA polimerasa y en consecuencia no se lleva a cabo la transcripción. Los operones pueden tener un control positivo o negativo, dependiendo de la acción de las proteínas reguladoras que pueden actuar como inductores o represores. El operón, por tanto, constituye una unidad genética de transcripción coordinada.¹⁴

Se ha tratado de identificar la función de las enzimas producidas por cada uno de estos genes, sin lograrlo adecuadamente. La hipótesis más aceptada sugiere que el *Ica A* codifica una N-acetil-glucosaminil transferasa que es la enzima clave para la síntesis de PIA; el *Ica B* produce secuencias de señales típicas que se secretan al medio, y los *Ica C* y *D* codifican proteínas que exhiben características de proteínas de membrana. Desafortunadamente las funciones específicas de los genes *Ica B*, *C* y *D* son aún desconocidas. Se presume que todas las enzimas productoras de PIA son transmembranales (Figura 1). Además, se ha observado en bacterias mutantes, generadas en el laboratorio, que los genes *A* y *D* son indispensables para la formación del PIA. La expresión fenotípica del operón de *Ica* es la producción de PIA; sin embargo, se ha visto que algunas cepas de *Staphylococcus* son fenotípicamente negativas y que posterior a varios pasos de cultivos, expresan de nuevo la producción de PIA. De la misma forma

se observó que las bacterias que eran positivas en un principio, tras varios pasos en agar dejaban de producir slime y no formaban biofilm.^{31, 32}

Otros estudios mostraron que los *Staphylococcus* que no producían biofilm al ser sometidos a un medio ambiente adverso, como anaerobiosis o bajas concentraciones de antibióticos, expresaban los genes de *Ica* y producían slime y formaban biofilm. Esto hizo que a finales de la década pasada se reportara la presencia de un elemento trasladable (transposón) dentro del operón de *Ica* que tenía la capacidad de moverse a diferentes lugares, y dependiendo de donde se ubicara, se expresarían los genes del operón de *Ica* o se "apagarían". Otra región del operón es el gen *IcaR*, que tendría una función de regulación.^{8, 11, 29}

A este elemento genético activamente móvil que influye en la expresión del gen de *Ica* se le denominó elemento de inserción *IS256* (por sus siglas en inglés, y el número consecutivo del registro de transposones en el genoma bacteriano).^{8, 11, 29} La presencia de este elemento de inserción *IS256* en el operón de *Ica* explicaría por qué existe la capacidad de producirlo o no, según el medio ambiente en el que se encuentre la bacteria.

Desafortunadamente la importancia clínica de estos avances es aún incierta y controversial. Existen muchos factores involucrados en la capacidad de los *Staphylococcus* de adherirse a las superficies plásticas, como los *Staphylococcus* productores de hemaglutininas que tienen la capacidad de rodear el biofilm de eritrocitos, lo que le confiere a la colonia mayor protección contra los mecanismos de defensa del huésped.^{8, 11}

Actualmente se han publicado algunas series en las cuales se muestra que los antibióticos que tienen una estructura molecular más pequeña, como el caso de rifampicina, superan a otros como la vancomicina y linezolid para erradicar la infección. Estos últimos necesitan altas concentraciones y no son 100% efectivos.^{25, 27, 33}

En nuestro hospital, el problema de infecciones relacionadas a dispositivos plásticos –principalmente catéteres venosos centrales, temporales o permanentes– es severo e implica riesgos y altos costos en la atención de los pacientes con enfermedades graves o crónico-degenerativas. La mayoría de estas infecciones son causadas por *Staphylococcus epidermidis* y otras especies de SCN y en menor frecuencia por *S. aureus*.

A pesar de tener el aislamiento del microorganismo causal y la sensibilidad *in vitro* y proporcionar la mejor opción terapéutica, según lo establecido en la literatura mundial, no se obtiene erradicación microbiológica. Esto obliga a retirar el dispositivo plástico, situación en ocasiones imposible en pacientes en estado crítico, con accesos vasculares limitados y que dependen de la infusión intravenosa para mantener sus condiciones hemodinámicas, o bien en pacientes con dispositivos permanentes, lo cual implica retrasar el tratamiento que reciben e incrementar los costos de atención.

En la mayoría de los estudios se ha relacionado el biofilm con la persistencia de la infección en estos dispositivos, por lo que se inició una línea de investigación para analizar diferentes cepas de SCN con la finalidad de determinar la frecuencia de cepas productoras de slime y la presencia de los genes del operón del *Ica* en nuestro hospital, así como la posición del elemento de inserción *IS256*.

Encontramos una frecuencia de 19% de cepas productoras de slime y por especie de 32% en *S. epidermidis*. Al tratar de establecer una relación entre la falla terapéutica en pacientes con infección relacionada a dispositivos plásticos, la capacidad de las cepas de producir slime, la presencia de los genes del *Ica* y la posición del elemento de inserción *IS256*, no se pudo demostrar en 100 cepas aisladas de pacientes una mayor frecuencia de producción de biofilm y la falla terapéutica. Al parecer la falta de producción de biofilm por parte de las cepas de *S. epidermidis* condicionó un mayor número de fallas terapéuticas, a diferencia de las cepas productoras que tuvieron un porcentaje menor de fracasos. Esta diferencia de porcentajes, al compararse mediante prueba de χ^2 , dio un resultado estadísticamente significativo (OR 0.16, IC 0.03-0.82, $p < 0.009$).³⁴

Aparentemente en un escenario clínico la colonización de dispositivos plásticos por cepas formadoras de biofilm confieren cierta protección al individuo e incluso responden mejor al tratamiento antimicrobiano establecido, a diferencia de las no productoras, que tienen un porcentaje de falla terapéutica más alta, con indicación de retiro del dispositivo plástico. Posiblemente éste se debe a que –*in vitro* y probablemente *in vivo*–, el biofilm interfiere con la acción de los antibióticos, los cuales presionan selectivamente para que las colonias sobrevivientes lo formen. Estas bacterias se encuentran adheridas firmemente a la superficie plástica interna del catéter, lo que impide

que tengan contacto con el sistema inmunológico y en consecuencia no hay sintomatología clínica de infección. Cuando la colonia llega a un determinado punto crítico, desprende bacterias al torrente circulatorio y éstas causan la respuesta inflamatoria; pero al ser poco numerosas y de lento crecimiento, son rápidamente depuradas por los fagocitos y/o antibióticos, a diferencia de lo que pudiera suceder con las no productoras, que se adhieren laxamente a la superficie plástica interna, con liberación de gran cantidad de bacterias, e inducen una respuesta inflamatoria más intensa. Además, estas bacterias tendrían una capacidad normal de crecimiento, logrando colonizar diferentes órganos del cuerpo.

Estos resultados nos llevan al cuestionamiento sobre la importancia real del biofilm como factor de virulencia en infecciones asociadas a dispositivos plásticos.

Es necesario estudiar el comportamiento del operón en cepas que se encuentran adheridas a los catéteres y no sólo de las bacterias que se desprendieron al obtener el cultivo. También es necesario determinar si existen estrategias terapéuticas superiores a las que habitualmente se recomiendan para el manejo de estas infecciones, con el fin de lograr un menor número de fallas.

En conclusión, no podemos individualizar los diferentes factores de virulencia que existen y que evolutivamente han sido diseñados para permitir la sobrevivencia de las bacterias. La interacción de éstos es compleja y en constante evolución, por lo que aún necesitamos comprender mucho más de la "fisiología" bacteriana para diseñar armas más eficaces que nos permitan ofrecer respuestas terapéuticas adecuadas; empero, la mejor terapéutica sigue siendo la prevención.

Bibliografía

1. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Staphylococcus, in *Principles and practice of infectious diseases*, 5ª ed., Panamericana, EUA, 2000, p. 2096.
2. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, et al. Staphylococcus en *Diagnóstico microbiológico*, 4ª ed., Panamericana, Argentina, 2000, p. 355.
3. Lowy F. Staphylococcus aureus infections. *New Engl J Med* 1998; 339: 520-532.
4. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 256-264.
5. Peters G, Locci R, Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. *Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol* 1981; 173: 293-299.
6. O'Toole G, Kaplan H, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 50-68.
7. Elliott, T. Can antimicrobial central venous catheters prevent associated infection? *Br J Haematol* 1999; 107: 235-241.
8. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1367-1378.
9. Rupp M, Fey P, Heilmann C, Gotz F. Characterization of the importance of Staphylococcus epidermidis autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* 2001; 183: 1038-1042.
10. Finkelstein E, Jekel J, Troidle L, Gorban-Brennan N, Finkelstein F, et al. Patterns of infection in patients maintained on long-term peritoneal dialysis therapy with multiple episodes of peritonitis. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 377-385.
11. O'Gara J, Humphreys H. Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology* 2001; 50: 582-587.
12. Bayston R, Penny SR. Excessive production of mucoïd substance in Staphylococcus SIIA: a possible factor in colonization of Holter shunts. *Dev Med Child Neurol* 1972; 14: 25-28.
13. von Eiff C, Heilmann C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 843-846.
14. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J Biol Chem* 1998; 273: 18586-18593.
15. Ishak MA, Gröschel DHM, Mandel GL, Wensel RP. Association of slime with pathogenicity of CNS causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 1025-1029.
16. Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA. Characterization of clinically significant strains of CNS. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 258-269.
17. Baldassarri L, Donnell G, Gelosia A, et al. Purification and characterization of the staphylococcal slime - associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermidis clinical isolates. *Infect Immun* 1996; 64: 3410-3415.
18. Mack D, Fischer W, Krokotch A, Leopold K, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear β -1-6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178: 175-183.
19. Freeman J, Falkner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42: 872-874.
20. Christensen G, Simson J, Younger L, Baddour F, Barrett D, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 996-1006.
21. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in Staphylococcus epidermidis during in vitro and I vivo foreign body infections. *J Infect Dis* 2003; 188: 730-737.
22. de Silva G, Kantzanou M, Justice A, Massey R, Wilkinson A, Day N, Peacock S. The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microb* 2002; 40: 2382-2388.
23. Lyte M, Freestone P, Neal C, Olson B, Haigh R, Bayston R, Williams P. Stimulation of Staphylococcus epidermidis growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* 2003; 361(9352): 130-135.
24. Cramton S, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.
25. Curtin J, Cormican M, Fleming G, Keelehan J, Collieran E. Linezolid compared with eperezolid, vancomycin, and gentamicin in an in vitro model of antimicrobial lock therapy for Staphylococcus epidermidis central venous catheter-related biofilm infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(10): 3145-3148.
26. Wilcox M, Kite P, Mills K, Sugden S. In situ measurement of Linezolid and Vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. 2001; 47: 171-175.
27. Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, Hanna H, Hachem R, et al. In Vitro and Ex Vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(11): 3580-3585.
28. Christensen GD, Bisno AL, Simpson WA. Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37: 318-325.
29. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Loner I, Gotz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology* 1999; 32: 345-356.
30. Dietrich M, Holger Re, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch J, et al. Identification of Three Essential Regulatory Gene Loci Governing Expression of Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin and Biofilm Formation. *Infect Immun* 2000; 68: 3799-3807.
31. Lappin-Scott H, Bass C. Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control* 2001; 29: 250-251.
32. Ziebuhr W, Heilmann F, Gotz P, Meyer K, et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in Staphylococcus epidermidis blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 1997; 65: 890-896.
33. Zheng Z, Stewart P. Penetration of Rifampin through Staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2): 900-903.
34. Diamond J, Miranda G, Solórzano F, Leños B. Detección de los genes del operón de *ica* y producción de polisacárido de adherencia intercelular (PIA) en cepas de Staphylococcus spp. aisladas de pacientes con infecciones asociadas a catéteres. Tesis de Infectología Pediatría 2003. HP CMN SXXI IMSS.