



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD “ DR.
ENRIQUE ORTEGA MOREIRA ”**

**TOLERANCIA IN VITRO DE BIOPELÍCULAS
POLIMICROBIANAS DE *STAPHYLOCOCCUS
HAEMOLYTICUS* Y *CANDIDA ALBICANS* A
LA ACTIVIDAD ANTIINFECCIOSA DE LA
DALBAVANCINA EN COMBINACIÓN CON
ANIDULAFUNGINA**

Artículo presentado como requisito para la obtención del título:

Médico General

Por la (os) estudiante(s):

Danna Arciniega Alcívar

Bajo la dirección de:

Dr. Esteban Fernández Moreira

Universidad Espíritu Santo
Carrera de Medicina
Samborondón - Ecuador
Mayo de 2024

Tolerancia *in vitro* de biopelículas polimicrobianas de *Staphylococcus haemolyticus* y *Candida albicans* a la actividad antiinfecciosa de la dalbavancina en combinación con anidulafungina.

In vitro tolerance of poly-microbial biofilms of *Staphylococcus haemolyticus* and *Candida albicans* to the anti-infective activity of dalbavancin in combination with anidulafungin.

Danna Arciniega Alcívar

darciniega@uees.edu.ec

Esteban Fernández Moreira

estebanfernandez@uees.edu.ec

Universidad Espiritu Santo, Samborondón , Ecuador

RESUMEN

Las infecciones provocadas por la formación de biopelículas bacterianas en dispositivos invasivos como catéteres y prótesis son un problema de salud pública. La bacteria coagulasa negativa *Staphylococcus haemolyticus*, es un patógeno recurrente en estas infecciones, así como la levadura *Candida albicans*. Es habitual la presencia de ambos microorganismos en infecciones causadas por catéteres en estos dispositivos. Estos microorganismos crecen formando biopelículas, lo que dificulta el tratamiento de sus infecciones y dificulta la recuperación del paciente. La dalbavancina es un antibiótico semisintético de clase lipo-glicopéptido que se utiliza como agente antiinfeccioso para eliminar biopelículas de microorganismos en gran parte grampositivos. La anidulafungina es un medicamento antifúngico de la clase de la equinocandina con una gran eficacia contra las cepas de levadura resistentes, y es un agente de eliminación de biopelículas.

OBJETIVO: Evaluar el aumento de la resistencia a anidulafungina y dalbavancina de *Staphylococcus haemolyticus* y *Candida albicans* cuando crecen en biopelículas polimicrobianas comparado a su crecimiento en cultivos líquidos.

MÉTODOS: Ensayos *in vitro* utilizando el crecimiento de biopelículas polimicrobianas en un reactor de biopelículas (CBR) de los CDC.

RESULTADOS: La concentración inhibitoria mínima de anidulafungina contra *Candida albicans* aumentó cuando ésta creció en biopelículas mientras que la actividad de dalbavancina contra biopelículas de *Staphylococcus haemolyticus* no presentó cambios respecto a su acción sobre formas planctónicas.

CONCLUSIONES: Se observó un aumento en la tolerancia de *C. albicans* al AFG en biopelículas polimicrobianas, mientras que la resistencia de *S. haemolyticus* al DAL no mostró cambios significativos en el mismo ambiente.

Palabras clave: Biopelículas; *Candida albicans*; *Staphylococcus haemolyticus*; combinaciones de medicamentos; agentes antiinfecciosos; reactor de biopelícula de los CDC

ABSTRACT

Infections caused by the formation of bacterial biofilms on invasive devices such as catheters and prostheses are a public health problem. The coagulase-negative bacteria *Staphylococcus haemolyticus* is a recurrent pathogen in these infections, as well as the yeast *Candida albicans*. The presence of both microorganisms and infections caused by catheters in these devices is common. These microorganisms grow by forming biofilms, which makes it difficult to treat their infections and hinders the patient's recovery. Dalbavancin is a semisynthetic lipo-glycopeptide class antibiotic used as an anti-infective agent to eliminate biofilms of largely gram-positive microorganisms. Anidulafungin is an echinocandin class antifungal drug with high efficacy against resistant yeast strains, and is a biofilm removal agent.

OBJECTIVE: To evaluate the increase in resistance to anidulafungin and dalbavancin of *Staphylococcus haemolyticus* and *Candida albicans* when grown in polymicrobial biofilms compared to their growth in liquid cultures.

METHODS: In vitro assays using polymicrobial biofilm growth in a CDC biofilm reactor (CBR).

RESULTS: The minimum inhibitory concentration of anidulafungin against *Candida albicans* increased when it grew in biofilms, while the activity of dalbavancin against *Staphylococcus haemolyticus* biofilms did not present changes with respect to its action on planktonic forms.

CONCLUSIONS: An increase in the tolerance of *C. albicans* to AFG was observed in polymicrobial biofilms, while the resistance of *S. haemolyticus* to DAL did not show significant changes in the same environment.

Key words: Biofilms; *Candida albicans*; *Staphylococcus haemolyticus*; drug combinations; anti-infective agents; CDC biofilm reactor.

INTRODUCCIÓN

Dos patógenos se destacan entre las infecciones más comunes adquiridas en el hospital. La primera es *Staphylococcus haemolyticus* o *S. haemolyticus*, una bacteria grampositiva y anaeróbica facultativa que es coagulasa negativa, no mótil, no formadora de esporas, y que crece en todas las clases de medios de cultivo utilizando glucosa, maltosa y fructosa como fuente de energía (1). *S. haemolyticus* es la segunda especie de *Staphylococcus* coagulasa negativa (CoNS) aislada con más frecuencia de los hemocultivos (2). En su posición, la levadura *Candida spp.* (en su mayoría *Candida albicans* o *C. albicans*), es la quinta causa más común de infecciones adquiridas en el hospital. La tasa de mortalidad producida por la candidemia es de aproximadamente el 40 %. *C. albicans* se encuentra comúnmente en el tracto digestivo y la epidermis de los seres humanos. Esta levadura comensal se comporta como un microorganismo oportunista, ya que adquiere fácilmente un perfil patógeno como resultado de los cambios en el medio ambiente o en el sistema inmunológico del paciente. De hecho, *C. albicans* es el patógeno más frecuente que coloniza e infecta los lugares quirúrgicos donde los catéteres se manejan constantemente (3, 4).

Hay dos medicamentos para el tratamiento de estas infecciones. Uno es la dalbavancina o DAL, un nuevo y potente bactericida semisintético que pertenece a la familia de los lipo glicopéptidos que ha revolucionado el mundo de los tratamientos antimicrobianos debido a su capacidad para destruir biopelículas bacterianas (5,6). Recientemente aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), DAL tiene una gama de efectos anti infecciosos específicos para bacterias gram positivas. La otra es anidulafungina o AFG, una equinocandina semisintética obtenida de un producto de fermentación de *Aspergillus nidulans*. Este fungicida se considera

el tratamiento de primera línea para la candidiasis invasiva, ya sea en una forma sétil o en una biopelícula. (7, 8). AFG tenía una de las tasas de susceptibilidad más altas contra *Candida* (9). AFG ha sido validado por la Agencia Europea de Medicamentos (10).

Debido a que la tolerancia a estos agentes antiinfecciosos es una cuestión de preocupación clínica, el objetivo de este estudio fue en primer lugar describir la cinética de adhesión y la formación de biopelículas polimicrobianas para luego evaluar la eficacia profiláctica de una combinación de antibiótico DAL y fungicida AFG contra las biopelículas de *S. haemolyticus* y *C. albicans*, respectivamente, en comparación con sus formas planctónicas.

MÉTODOS

Aislamiento de microorganismos: La capacidad de formación de biopelículas se evaluó mediante el aislamiento de *S. haemolyticus* (ID: B2004000008089) y *C. albicans* (ID: P2015000152) a partir de hemocultivos de pacientes ingresados en la Clínica de la Universidad de Navarra (Pamplona, ESPAÑA) durante el periodo 2020 - 2022. La pureza y la identidad de cada aislado se verificaron mediante el cultivo en el medio BBL CHROMagar *Candida* (CHROMagar, París, FRANCIA) y luego utilizando ensayos colorimétricos VITEK-2™ YST ID para *C. albicans*, y en el caso de *S. haemolyticus* mediante el uso de cultivos de agar de sangre de cordero y ensayos colorimétricos VITEK-2™ GP ID para cocos grampositivos.

Reactor de biopelícula de los CDC (CBR): La biopelícula se cultivó utilizando un reactor de biopelícula de los CDC, un instrumento bien reconocido que cultiva biopelículas microbianas bajo alto cizallamiento y flujo continuo. Este método estandarizado por la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales permite el estudio de una gran variedad de biomateriales con diferentes composiciones, así como diversas propiedades fisicoquímicas y estructurales, como polímeros plásticos, metales y cerámicas, entre otros. Para ser introducido en un CBR, el biomaterial tenía que colocarse en forma de disco (es decir, cupón) y ajustarse a las dimensiones de 1,27 cm de diámetro y 0,3 cm de altura (11).

El procedimiento planteado en esta metodología en general fue plasmado a partir de pruebas estandarizadas para el uso de reactor de biopelícula de los CDC, que se detallan en el artículo citado previamente.

Inóculo: Las cepas se cultivaron al menos dos veces en agar de sangre (24 horas a 35,5 °C) para garantizar su pureza y viabilidad. La densidad celular de la suspensión obtenida de este cultivo fue medida con un nefelómetro y se ajustó a 0,5 en la escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Generación de biopelícula: El CBR estaba equipado con 24 discos de reacción de PTFE/silicio™ (o cupones) como base de fijación para la forma sésil y se cargó con 450 ml de medio de cultivo de infusión de corazón cerebral (BHI) y 1 ml del inóculo de cada cepa. La concentración final de microorganismos en el CBR osciló entre 8×10^4 a $2,7 \times 10^5$ UFC/mL.

Preparación de soluciones de stock de antimicrobianos: Sobre la base de los procedimientos estándar especificados por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) en su manual M07-A9 para la dilución antimicrobiana, se pesaron 4 mg de DAL o de AFG y se disolvieron en 4 ml de agua destilada estéril; lo que resultó en una concentración final de 1.000 µg/ml para cada antimicrobiano.

Manipulación y análisis de biopelícula: Para separar la biopelícula adherida a la superficie de un biomaterial, se agitó cada tubo con un disco a 2.500 rpm durante 30 segundos, luego se sonicó a 50 kHz en un baño de sonicador (P-Selecta, Ultrasons H, Barcelona, ESPAÑA) durante 5 minutos, y se agitó en el vortex durante 30 segundos adicionales. Posterior a esto, para determinar el número de células viables adheridas por unidad de área del material, el caldo obtenido después de la sonicación se diluyó (1:10, 1: 100, 1: 1000 y 1: 10.000) en agar Mueller-Hinton (Becton Dickinson, EE. UU.), y 0,1 ml de cada dilución se cultivó en agar Bushnell Haas (Becton Dickinson, EE. UU.). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los resultados obtenidos para el cultivo sonicado, expresado en UFC/mL, se transformaron en Log_{10} del número de células adheridas por unidad de área (UFC/cm²; el área de superficie de cada disco fue de 1,267 cm²) de acuerdo con la

siguiente ecuación: $\text{Log}_{10} (\text{UFC}/\text{cm}^2) = \text{Log}_{10} (\text{UFC medio}/\text{volumen plateado}) * (\text{volumen raspado}/\text{cupón de superficie}) * (\text{dilución})$ (12).

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Los puntos de corte de la sensibilidad a los antimicrobianos tanto de *C. albicans* como de *S. haemolyticus* se establecieron por el CLSI en su manual M100-S25 al seguir el método de macrodilución establecido en la guía M07-A9.

Dado el límite de 24 discos de reacción para cada ensayo de CBR, se utilizó un método de tablero de ajedrez de control, también conocido como *checkerboard assay*. Este ensayo es usado para determinar el comportamiento de dos fármacos antimicrobianos (en este caso AFG y DAL) colocados simultáneamente contra un mismo organismo, en comparación con sus efectos individuales. Mediante este método es posible determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC en inglés por Minimum Inhibitory Concentration) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de una combinación de antibióticos para un determinado organismo y evidenciar de esta manera si existen cambios en la acción de un fármaco cuando está en presencia de otro.

Su procedimiento se basa en la colocación del antifúngico AFG en tubos o pocillos colocados en columnas que se han diluido a lo largo del eje horizontal en filas de tubos o pocillos en los que cada uno contiene la misma cantidad de antibiótico DAL que se ha diluido a lo largo del eje vertical, resultando así la coexistencia de 2 antibióticos con 2 concentraciones en cada tubo, con la presencia de un control. Estos intervalos de diluciones van por debajo y por encima de su MIC establecida (13).

En consecuencia, los efectos microbicidas de cada tratamiento (ya sea antimicrobiano solo o en combinación) se expresaron como la concentración inhibitoria mínima para lograr un efecto del 50% (MIC_{50}) en la forma planctónica, así como la concentración mínima de eliminación de la biopelícula del 50% (MBEC_{50}).

Para interpretar si la acción del antimicrobiano es más fuerte en combinación o solo se debe realizar finalmente el índice FIC (concentración inhibitoria fraccionada) para cada antibiótico mediante la siguiente fórmula: $\text{FIC} = \text{FIC A} + \text{FIC B} = \text{A}/\text{CMIA} +$

B/CMIB. Donde A y B son la MIC del antibiótico combinado, mientras que CMIA y CMIB son la MIC del antibiótico solo. Si el resultado de este índice es $\leq 0,5$ se considera que la combinación de antibióticos fue sinérgica, si es ≥ 4 es antagónica, y si es entre $>0,5$ y ≤ 4 , se considera indiferente (14).

Estadísticas: El análisis estadístico se realizó utilizando el software de estadísticas JASP (<https://jasp-stats.org/>) para Windows. Los datos se expresaron como media y desviación estándar. Se llevó a cabo una ANOVA unidireccional con comparaciones múltiples de Tukey como prueba post hoc para analizar los resultados de los experimentos de erradicación de biopelícula. El umbral alfa se estableció en 0,05.

RESULTADOS

Los aislados en su forma planctónica se probaron primero por su susceptibilidad a cada uno de los agentes antimicrobianos aplicados individualmente. La interacción de las formas planctónicas de *C. albicans* y *S. haemolyticus* con cada uno de los agentes anti-infecciosos estudiados se correlacionan perfectamente con los puntos de corte establecidos. Por lo tanto, el planctónico *S. haemolyticus* por sí solo era sensible a la DAL (concentración umbral = 0,122 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y resistente a la AFG ($\text{MIC}_{50} = 125 \mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que *C. albicans* era sensible a la AFG (concentración umbral = 0,122 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y resistente a la DAL ($\text{MIC}_{50} = 250 \mu\text{g}/\text{ml}$). En consecuencia, las concentraciones más bajas de agentes antiinfecciosos solos o en combinación se establecieron en 0,244 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para experimentos posteriores.

La cinética de crecimiento de la biopelícula se determinó en un reactor de biopelículas de los CDC durante 24 horas. Cuando se probó la capacidad de la DAL para penetrar y destruir la biopelícula de *S. haemolyticus*, fue necesario aumentar 16 veces su concentración de las formas planctónicas ($\text{MIC}_{50} = 1,953 \mu\text{g}/\text{mL}$) a las formas sésiles o en biopelículas ($\text{MBEC}_{50} = 31,250 \mu\text{g}/\text{mL}$) para lograr un efecto antibacteriano del 50%. (Tabla 1). En cuanto a la levadura, se requirió una concentración 4 veces mayor de AGF para un efecto fungicida contra las biopelículas formadas por *C. albicans* ($\text{MBEC}_{50} = 15,625 \mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación con sus formas planctónicas ($\text{MIC}_{50} = 3,906 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabla 1). Curiosamente, en los experimentos con preparaciones

polimicrobianas, el MBEC₅₀ (250 µg/mL) fue hasta 32 veces mayor que el MIC₅₀ (7,812 µg/mL) (Tabla 1). En las tres condiciones experimentales, el número de células viables por disco de reacción de PTFE (Log₁₀ UFC/cm²) después de los tratamientos antimicrobianos con concentraciones de MBEC₅₀ se redujo aproximadamente a la mitad.

Tabla 1. *Efectos microbicidas de dalbavancina (DAL) y anidulafungina (AFG) contra la formación de biopelículas. Tenga en cuenta que las preparaciones monomicrobianas se trataron con su agente antiinfeccioso específico, mientras que las preparaciones polimicrobianas se trataron simultáneamente con ambos compuestos.*

	Planktonic			Biofilm		
	MIC (ug/mL)			Log ₁₀ CFU/CM ²		
	50	80	90	MBEC ₅₀ (ug/mL)	Test	Control
<i>S. haemolyticus</i>	1.953	7.812	7.812	31.250	3.44	6.89
<i>C. albicans</i>	3.906	7.812	7.812	15.625	3.41	6.87
<i>S. haemolyticus</i> + <i>C. albicans</i>	7.812	31.25	62.50	250.0	2.63	4.39

Abreviaciones: MIC: Concentración Inhibitoria Mínima para lograr un 50%, 80%, y 90% efecto microbicida en su fase planctónica; MBEC₅₀: Concentración Mínima Inhibitoria para Eliminación de Biopelículas al 50% de efecto MFC₅₀; CFU: Unidad Formadora de Colonias.

Las posibles interacciones farmacológicas entre los agentes antiinfecciosos se analizaron utilizando el método de tablero de ajedrez detallado en la metodología. La figura 1 representa los resultados del ensayo, demostrando la tolerancia de biopelículas monomicrobianas o polimicrobianas a los agentes antiinfecciosos DAL y AFG. Cuando se cultiva en una fase polimicrobiana, la susceptibilidad de *C. albicans* al tratamiento con AFG disminuyó drásticamente (ver el valor atípico MIC₉₀). El índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) resultó ser 2 y, por lo tanto, se define como "no interferente".

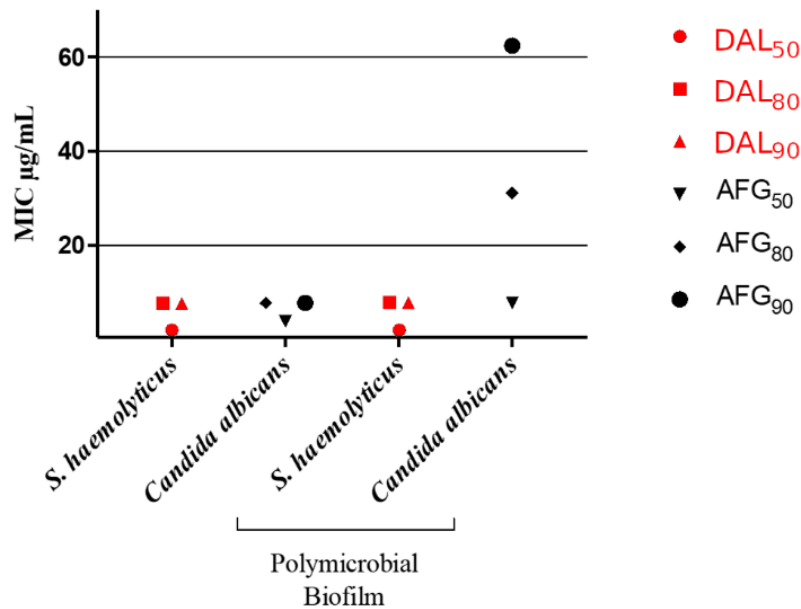


Figura 1. Representación gráfica de la susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. haemolyticus* y *C. albicans* en fases de biopelícula monomicrobiana versus polimicrobiana. Se utilizó anidulafungina (AFG) contra *C. albicans* y dalbavancina (DAL) para tratar *S. haemolyticus*.

La figura 2 representa los efectos de los antimicrobianos en los experimentos de erradicación de biopelículas. Las ANOVA revelaron un efecto microbicida significativo de anidulafungina y dalbavancina en las biopelículas maduras de *C. albicans*, $p < 0,001$; Figura 2A), y *S. haemolyticus*, $p < 0,001$; Figura 2B), respectivamente. Las concentraciones letales (250 µg/ml) de AFG y DAL causaron una eliminación casi de las biopelículas de *C. albicans* (80%) y *S. haemolyticus* (91%) respectivamente. Cuando la biopelícula polimicrobiana se formó a partir de una mezcla de *S. haemolyticus* y *C. albicans*, la combinación de antimicrobianos resultó en una menor reducción del número de UFC, $p < 0,001$; Figura 2C). En el caso de la concentración más alta (250 µg/mL), la detención del crecimiento de la biopelícula polimicrobiana alcanzó solo el 46,5%.

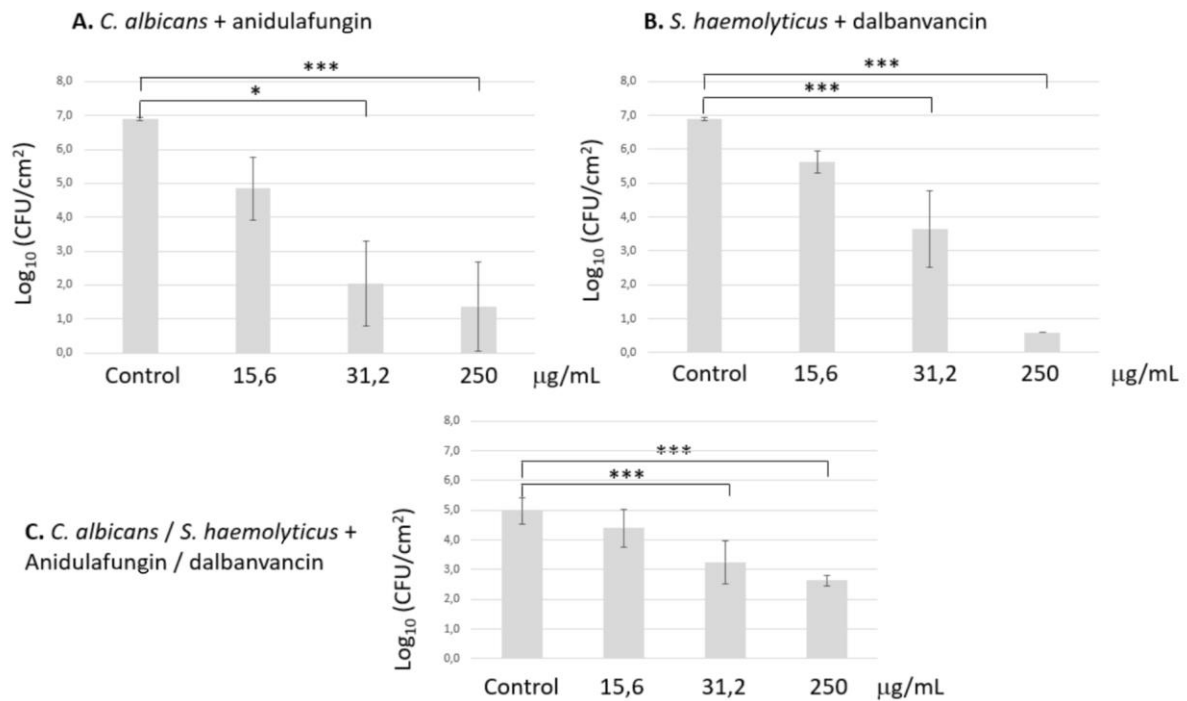


Figura 2. Erradicación del número de células formadoras de biopelículas viables (expresadas como UFC) a diferentes concentraciones de antimicrobianos. Las biopelículas se cultivaron en condiciones dinámicas en un reactor CDC. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se muestran como promedio \pm SD. ANOVA unidireccional seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este estudio fueron el aumento de la tolerancia a los agentes antiinfecciosos DAL (antibiótico) y AFG (fungicida), según lo establecido al comparar las formas planctónicas de dos microorganismos con sus formas sésiles individuales. Cabe destacar que la formación de una biopelícula polimicrobiana produjo una mayor tolerancia de *C. albicans* contra el fungicida (AFG), que de *S. haemolyticus* contra el antibiótico (DAL).

El aumento de 16 veces del MBEC₅₀ de DAL para erradicar las biopelículas de *S. haemolyticus* con respecto a la MIC₅₀ necesaria para tratar su forma planctónica (Tabla 1) estuvo de acuerdo con una investigación anterior (15), en la que se informó una concentración más alta de DAL, que oscilaba entre 0,09 µg/mL y 0,19 µg/mL, para *Staphylococcus spp* coagulasa negativo. Las concentraciones de DAL necesarias para lograr un efecto bactericida contra una biopelícula de *Staphylococcus*

in vitro probablemente se pueden alcanzar in vivo, lo que sugiere una solución fuerte y efectiva contra la formación de biopelículas en catéteres y dispositivos invasivos (15). En el caso de AFG, se requirió una concentración 4 veces más para una biopelícula de *C. albicans* (Tabla 1), que es consistente con el aumento de la concentración de AFG como el único agente antimicrobiano contra las biopelículas de *C. albicans* de 0,016 µg/mL a 0,060 µg/mL (16). También es importante señalar el aumento significativo observado en las concentraciones inhibitorias mínimas de AFG al tratar la combinación planctónica polimicrobiana (Figura 1), que osciló desde una MIC₅₀ de 7,812 µg/mL hasta una MIC₉₀ de 62,50 µg/mL, lo que dificulta el alcance de estas concentraciones en el plasma.

Al estudiar las biopelículas polimicrobianas formadas por *C. albicans* junto con *S. haemolyticus*, se encontró una reducción del número de células formadoras de biopelículas viables en el disco de reacción de los cupones de control de 6,88 Log₁₀ UFC/cm² (biopelículas monomicrobianas) a 4,93 Log₁₀ UFC/cm² (biopelícula polimicrobiana) (Tabla 1). Esta disminución podría deberse al espacio limitado que ocupan las dos especies y a su competencia nutricional y, por lo tanto, a las interacciones de los microorganismos. Lo que es más interesante, cuando *C. albicans* formó una biopelícula polimicrobiana, la levadura mostró una mayor tolerancia a la AFG que en una estructura monomicrobiana, como se informó en otra parte (17), mientras que el MIC de DAL requerido para eliminar *S. haemolyticus*, siguió siendo la misma que en una biopelícula monomicrobiana (Figura 1). El aumento en la resistencia de *C. albicans* podría deberse a la conformación estructural de la propia biopelícula, dado que se ha observado una mayor resistencia a la anidulafungina en biofilm comparado con las Cándidas planctónicas (18).

La prueba de tablero de ajedrez no reveló ninguna interferencia entre DAL y AFG, pues el índice FIC fue como resultado de 2 cuando ambos medicamentos se combinaron en tratamientos mixtos, por lo tanto se podría intuir que la disminución de la actividad antifúngica de AFG contra *C. albicans* en una biopelícula polimicrobiana no se debió al antagonismo entre fármacos, como lo demuestra la actividad de DAL contra el crecimiento de *S. haemolyticus*, que permaneció intacta en una biopelícula mixta (Figura 1). La tolerancia al AFG podría deberse a la conformación estructural

de la biopelícula en sí, donde el nivel de penetración del antimicrobiano probablemente se vio comprometido.

En resumen, era probable que el aumento en la tolerancia a los antimicrobianos de las biopelículas polimicrobianas (Figura 2) se debiera a la mala penetración de AFG, lo que condujo a una mayor tolerancia a los fungicidas de *C. albicans*. Este hallazgo puede considerarse un fallo terapéutico del fungicida en combinaciones antimicrobianas. Por el contrario, el antibiótico DAL podría considerarse un antimicrobiano destructivo para una biopelícula formada por *S. haemolyticus*, y el tratamiento de elección para sus infecciones.

CONCLUSIONES

La investigación reveló resultados significativos sobre la resistencia de biopelículas polimicrobianas a los agentes antiinfecciosos DAL (antibiótico) y AFG (fungicida), en comparación con sus formas planctónicas individuales. Se observó un aumento en la tolerancia de *C. albicans* al AFG en biopelículas polimicrobianas, mientras que la resistencia de *S. haemolyticus* al DAL no mostró cambios significativos en el mismo ambiente. Este aumento en la tolerancia por su lado, se atribuye de forma hipotética a la estructura de la biopelícula, donde la penetración del AFG se vio comprometida, resultado evidenciado por el aumento de la concentración mínima inhibitoria de AFG en la estructura de biopelículas polimicrobianas. Por otro lado, el DAL demostró ser efectivo contra las biopelículas formadas por *S. haemolyticus*.

Los hallazgos destacan la importancia de considerar la composición y la estructura de las biopelículas en el diseño de estrategias terapéuticas. Mientras que el DAL podría ser una opción efectiva para tratar infecciones causadas por *S. haemolyticus*, el AFG podría no ser tan eficaz contra biopelículas polimicrobianas debido a su limitada penetración. Estos resultados subrayan la necesidad de realizar más énfasis en el desarrollo de nuevas investigaciones de esta índole, con nuevas variaciones en las concentraciones y en presencia y ausencia de otros microorganismos, para de esa manera poder desarrollar enfoques terapéuticos más específicos y efectivos contra las biopelículas polimicrobianas, teniendo en cuenta la resistencia diferencial

de los microorganismos y las complejas interacciones dentro de las estructuras que cada uno forma.

Financiamiento:

Esta investigación se realizó sin ninguna fuente de financiamiento.

REFERENCIAS

1. Daniel B, Saleem M, Naseer G, Fida A. Significance of *Staphylococcus haemolyticus* in hospital acquired infections. *J Pioneer Med Sci.* 2014; 4(3):119-125. <https://www.researchgate.net/publication/261174113>
2. Bakthavatchalam YD, Sudarsanam TD, Babu P, Munuswamy E, Muthuirulandi Sethuvel DP, Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Methicillin-Susceptible Teicoplanin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Isolate from a Bloodstream Infection with Novel Mutations in the tcaRAB Teicoplanin Resistance Operon. *Jpn J Infect Dis.* 2017; 70(4):458-460. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.482>.
3. Kong EF, Tsui C, Kucharíková S, Andes D, Van Dijck P, Jabra-Rizk MA. Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. *MBio.* 2016; 7(5): e01365–16–12. <https://doi.org/10.1128/mbio.01365-16>.
4. Jung P, Mischo CE, Gunaratnam G, Spengler C, Becker SL, Hube B, Jacobs K, Bischoff M. *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence.* 2020 Dec;11(1):1453-1465. doi: 10.1080/21505594.2020.1836902. PMID: 33108253; PMCID: PMC7595616.
5. Žiemytė M, Rodríguez-Díaz JC, Ventero MP, Mira A, Ferrer MD. Effect of Dalbavancin on Staphylococcal Biofilms When Administered Alone or in Combination with Biofilm-Detaching Compounds. *Front Microbiol* 2020;11:553. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00553>.
6. Oliva A, Stefani S, Venditti M, Di Domenico EG. Biofilm-Related Infections in Gram-Positive Bacteria and the Potential Role of the Long-Acting Agent

- Dalbavancin. *Front Microbiol.* 2021;22;12:749685. [https://doi: 10.3389/fmicb.2021.749685](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.749685)
7. Rogiers O, Holtappels M, Siala W, Lamkanfi M, Van Bambeke F, Lagrou K, Van Dijck P, Kucharíková S. Anidulafungin increases the antibacterial activity of tigecycline in polymicrobial *Candida albicans/Staphylococcus aureus* biofilms on intraperitoneally implanted foreign bodies. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 1;73(10):2806-2814. [https://doi: 10.1093/jac/dky246](https://doi.org/10.1093/jac/dky246).
 8. Vitális E, Nagy F, Tóth Z, Forgács L, Bozó A, Kardos G, Majoros L, Kovács R. Candida biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. *Mycoses.* 2020;63(4):352-360. [https://doi: 10.1111/myc.13049](https://doi.org/10.1111/myc.13049).
 9. Bilal H, Shafiq M, Hou B, Islam R, Khan MN, Khan RU, Zeng Y. Distribution and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species from mainland China: A systematic analysis. *Virulence.* 2022;13(1):1573-1589. [https://doi: 10.1080/21505594.2022.2123325](https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2123325).
 10. CHMP. Ecalta, INN-anidulafungin EMA/304231/2020 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 2020
 11. Manville E, Kaya EC, Yucel U, Boyle D, Trinetta V. Evaluation of *Listeria monocytogenes* biofilms attachment and formation on different surfaces using a CDC biofilm reactor. *Int J Food Microbiol.* 2023 Aug 16;399:110251. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110251. Epub 2023 May 12. PMID: 37244228.
 12. Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology.* 2005;151, 3:757-762. [https://doi: 10.1099/mic.0.27709-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27709-0)
 13. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX.* 2021 Oct 11;8:101543. doi: 10.1016/j.mex.2021.101543. PMID: 34754811; PMCID: PMC8563647.
 14. American Society for Microbiology. Instructions to authors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:i–xx
 15. Svensson S, Hagstedt P, Söderquist B. The MIC distribution of dalbavancin differs between different coagulase-negative staphylococci. *JAC Antimicrob*

Resist. 2024 Apr 10;6(2):dlae063. doi: 10.1093/jacamr/dlae063. PMID: 38601789; PMCID: PMC11004784.

16. Valentín A, Cantón E, Pemán J, Fernandez-Rivero ME, Tormo-Mas MA, Martínez JP. In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(12):3449–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw316>
17. Marcos-Zambrano LJ, Gómez-Perosanz M, Escribano P, Zaragoza O, Bouza E, Guinea J. Biofilm Production and Antibiofilm Activity of Echinocandins and Liposomal Amphotericin B in Echinocandin-Resistant Yeast Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(6):3579–86. <https://doi.org/10.1128/aac.03065-15>
18. Maiolo EM, Oliva A, Tabin UF, Perrotet N, Borens O, Trampuz DA. Antifungal activity against planktonic and biofilm *Candida albicans* in an experimental model of foreign-body infection. *Journal of Infection*. 2016; 72(3):1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.12.008>