

EVALUACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN IMPLANTES DE TITANIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO: CASO CLÍNICO CON INFECCIÓN MÚLTIPLE Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

D. Forero^{a,b,g}, L. Medina^c, I. Vílchez^d, E. Cañizales^d, F. Sánchez^d, N. Camejo^b, C. Macero^f, N. Guevara^f, M. Fernández-Delgado^{d*}

^a Facultad de medicina “Luis Razzeti”, Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela. ^b Instituto de Investigación Biomédica y Vacunas Terapéuticas, Ciudad Bolívar, Venezuela. ^c Hospital “Ana Francisca Pérez de León II”, Caracas, Venezuela. ^d Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela. ^e Postgrado de Microbiología, IVIC, Caracas, Venezuela. ^f Centro Médico La Floresta. Caracas, Venezuela. ^g Servicio de enfermedades infecciosas del adulto, Hospital Universitario de Caracas, Caracas Venezuela

*Corresponding author, E-mail: milagro.fernandez@gmail.com

Received: 15-07-2024
Published: 27-03-2025

Accepted: 12-09-2024

ABSTRACT

In this study titanium implants from a patient undergoing spinal column surgery were evaluated to determine cellular morphologies and structures associated with the formation of biofilms. The patient presented postoperative infection by *Klebsiella pneumoniae* identified through microbiological culture and biochemical tests performed on the implants once they were removed. Subsequently, this person develops multiple infections with *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, and *Candida* spp. For observation by scanning electron microscopy (SEM), the implants were fixed in 2.5% glutaraldehyde in sterile PBS and stored at 4 °C. One replica was washed three times with PBS and distilled water, dehydrated in 50% ethanol, dried in an oven for 40 min, and covered with gold. SEM images demonstrated the formation of biofilms with bacterial cell morphologies such as cocci and bacilli of approximately 0.5-1 µm and a well-developed extracellular matrix. The coccoid forms are suggestive of the viable but nonculturable state described for *K. pneumoniae* as a defense mechanism for its survival, allowing this pathogen to remain for a long time in the biofilm, causing infection to the host and conferring immunological and antibiotic resistance. Crystal-like structures were evident, probably of bacterial origin. This research constitutes the first report that shows the formation of biofilms on titanium implants using SEM, associated with a clinical state of multiple infections and antibiotic resistance. This microscopy technique offers great utility in diagnosing biofilms related to bone implants.

Keywords: Biofilms, titanium implants, *Klebsiella pneumoniae*, SEM, multiple infection.

RESUMEN

En este estudio se evaluaron implantes de titanio provenientes de paciente intervenida quirúrgicamente de la columna vertebral con la finalidad de determinar morfologías celulares y estructuras asociadas con la formación de biopelículas. La paciente presentó infección postoperatoria por *Klebsiella pneumoniae* identificada a través de cultivo microbiológico y pruebas bioquímicas realizadas a los implantes una vez retirados. Posteriormente, desarrolla múltiples infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Candida* spp. Para su observación por microscopía electrónica de barrido (MEB), los implantes fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% en PBS estéril y conservados a 4 °C. Una réplica se lavó tres veces con PBS y agua destilada, se deshidrató en etanol al 50%, secó en estufa por 40 min y cubrió con oro. Las imágenes de MEB demostraron la formación de biopelículas con morfologías celulares bacterianas como cocos y bacilos de aproximadamente 0,5-1 µm y una matriz extracelular bien desarrollada. Las formas cocoides son sugestivas del estado viable no cultivable descrito para *K. pneumoniae* como un mecanismo de defensa para su supervivencia, permitiendo que este patógeno permanezca por largo tiempo en la biopelícula, causando infección al hospedador y confiriéndole resistencia inmunológica y antibiótica. Se evidenciaron estructuras parecidas a cristales probablemente de origen bacteriano. Esta investigación constituye el primer reporte que evidencia la formación de biopelículas en implantes de titanio usando MEB, asociadas a un cuadro clínico de múltiple infección y resistencia a antibióticos. Esta técnica de microscopía ofrece gran utilidad en el diagnóstico clínico de las biopelículas asociadas a implantes óseos.

Palabras clave: Biopelículas, implantes de titanio, *Klebsiella pneumoniae*, MEB, infección múltiple.

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos adheridas a superficies inertes, orgánicas o asociadas a interfases. Están caracterizadas por células rodeadas de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos (EPS) que le confieren adhesión irreversible al sustrato [1]. Pueden estar compuestas por una o múltiples especies microbianas que intercambian comunicación celular o *Quorum sensing*, información genética relacionada con acceso a los nutrientes, protección contra condiciones ambientales adversas y compuestos tóxicos, depredación, respuesta inmunitaria del huésped y mecanismos de resistencia a antibióticos [2], por lo que se convierten en complejos microbianos difíciles de erradicar [3, 4].

En ambientes clínicos se han reportado biopelículas en heridas, placa dental, lentes de contacto, catéteres, sondas, ambientes de quirófano, laboratorios, instrumental médico, equipos biomédicos, prótesis, entre otros [5-7]. Las biopelículas que se forman sobre implantes médicos pueden estar compuestas por una única especie o por múltiples especies bacterianas tanto grampositivas o gramnegativas, así como por hongos y levaduras [8]. Estos microorganismos pueden proceder del mismo implante, instrumental o equipos médicos, la piel o procesos infecciosos del paciente, personal sanitario, ambiente de quirófano y/u hospitalario. Cuando un implante presenta contaminación por biopelículas, varios factores influyen en su desarrollo. Inicialmente, los microorganismos deben adherirse a la superficie del implante el tiempo suficiente para que la adherencia sea irreversible (fase de adhesión) [9]. La comunicación y reconocimiento célula-célula es importante para promover su inmovilización temporal y el desarrollo de altas densidades poblacionales (fase de agregación). Las células microbianas deben permanecer unidas para la formación de canales en la estructura y proliferación de la biopelícula. Estos canales son necesarios para el acceso de nutrientes hasta las capas más profundas de la biopelícula. Finalmente, ocurre la dispersión de las células maduras para ubicar un nuevo sustrato, iniciar un nuevo ciclo de crecimiento de la biopelícula y prolongar la infección [10].

A nivel mundial se estima que más del 80% de las infecciones humanas son causadas por biopelículas. Entre éstas, las infecciones relacionadas con dispositivos médicos e implantes óseos se asocian con elevada morbilidad en pacientes y representan una enorme carga financiera para la población afectada y servicios de salud [11, 12]. En Venezuela, la información sobre la incidencia de infecciones por biopelículas en reemplazos óseos es muy escasa, pero en la práctica médica se conoce que existe un alto riesgo de infección de estas prótesis y serias consecuencias ocasionadas por su contaminación en la salud de los pacientes.

Entre los materiales más utilizados en implantes ortopédicos de fijación interna, como reemplazos por fracturas y fijación articular, se encuentra el acero inoxidable Bioline 316L. Este metal quirúrgico se utiliza para la restauración de la estructura anatómica debido a su resistencia mecánica, bajo costo, posibilidad de doblar y dar forma al implante para crear un ajuste personalizado en el quirófano [13]. A pesar de ello, presenta como principales desventajas los fenómenos de corrosión de la superficie y la alta tasa de productos de corrosión liberados a nivel local y sistémico, razones por las cuales muchos autores recomiendan al titanio como biomaterial de mejor elección en dispositivos y componentes biomédicos, especialmente como sustitutos de tejido duro, aplicaciones cardíacas y cardiovasculares, debido a sus propiedades deseables, tales como módulo de elasticidad relativamente bajo, biocompatibilidad, buena resistencia a la fatiga y a la corrosión [14]. No obstante, continúa siendo difícil una buena unión química del titanio con el hueso y la consiguiente formación de nuevos huesos en su superficie en la primera etapa después de la implantación. En consecuencia, las aleaciones de titanio están recibiendo mucha atención por especialistas que estudian biomateriales debido a que tienen mayor biocompatibilidad entre los biomateriales metálicos, excelente resistencia específica y a la corrosión y no ocasionan problemas alérgicos [15]. Pese a estas nuevas propiedades, diferentes estudios han demostrado la formación *in vitro* de biopelículas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en implantes de titanio [16-18].

Debido a que en Venezuela existe escasa información epidemiológica y muy pocos estudios referentes a infecciones causadas por biopelículas en implantes ortopédicos, específicamente en superficies de titanio, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar por microscopía electrónica de barrido (MEB) implantes de titanio extraídos de paciente femenino sujeta a intervención cervical, quien cursó con meningitis post-neuroquirúrgica y bacteriemia multirresistente a antibióticos, con el fin de determinar morfologías celulares y estructuras asociadas con la formación de biopelículas sobre la superficie del implante en las especies bacterianas identificadas por cultivo microbiológico.

Presentación del caso clínico

Paciente femenino de 19 años, quien fue evaluada en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Pérez de León II, Caracas, por presentar siete meses previos a su ingreso cervicalgia de leve a moderada intensidad y dos meses previos pérdida de fuerza muscular en las cuatro extremidades. Al momento de su ingreso, documentó cuadriparesia disarmónica e hipoestesia en el segmento C5-S1. El estudio de su imagen inicial evidenció lesión

ocupante de espacio (LOE) intramedular cervical C1-C4. Se realizó artrodesis cervical con colocación de implantes de titanio: tornillos de masas laterales en C2-C5 y transarticulares en C1 (Aesculap, Inc., PA, USA) (Fig. 1).



Fig. 1. Radiografía que muestra la colocación de implantes en columna cervical de la paciente (segmento C1-C5).

Previamente a la cirugía, los implantes fueron esterilizados con la certificación de Brain Surgical, C.A. (Caracas, Venezuela) como se detalla a continuación: 1) lavado manual con detergente enzimático (Prodet-Uno); 2) esterilización en cuatro ciclos con equipo STERRAD (tecnología ALL clear), sistema de gas de peróxido de hidrógeno y plasma empleado para esterilizar dispositivos médicos sin residuos tóxicos; 3) traslado al área quirúrgica, verificación y certificación de cinta testigo por parte del especialista. Adicionalmente a la artrodesis cervical se efectuó laminectomía descompresiva bilateral C1-C5, mielotomía C1-C5 y excrecís parcial del LOE intramedular (Fig. 2).



Fig. 2. Disposición de los implantes colocados en la columna cervical en segmento C1-C5.

Siete días posterior a la intervención, la paciente presenta secreción por la herida, enviándose esta muestra para cultivo microbiológico, con el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas. Debido a esta infección y por indicación del Infectólogo, fue necesario el retiro de los implantes. Se inicia antibioticoterapia con colistina y tigeciclina, encontrándose mejoría parcial; sin embargo, a los 20 días desarrolla meningitis bacteriana, realizándose cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR) con el aislamiento nuevamente de este patógeno. Recibe el mismo tratamiento de antibióticos con mejoría y posterior egreso; no obstante, presenta recurrencia a los dos meses y otra posterior a los cinco meses del postoperatorio, documentándose además hidrocefalia obstructiva. En todos los cultivos de LCR se aisló *K. pneumoniae*. Se mantuvo con antibioticoterapia por 10 días más y ante mejoría se dio egreso. A pesar de ello, regresa con clínica neurológica dada por alteración de la conciencia,

cervicalgia y un episodio emético, por lo que deciden ingreso. Se evidencia claro deterioro clínico postoperatorio (estupor más síndrome medular incompleto). Se indica terapia con ceftazidime/avibactam más aztreonam; no se logró su consecución y por ello se inició tigeciclina más colistina endovenosa e intratecal. Posteriormente, continúa presentando múltiples episodios de meningitis complicadas con hidrocefalia, necesitando la colocación de catéter de derivación ventricular. Además, desarrolla múltiples infecciones por otros microorganismos multirresistentes (*P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Candida* spp.), identificadas tanto en estudio de LCR como en hemocultivos, requiriendo esquemas de antibióticos (meropenem, levofloxacina) y antifúngicos (fluconazol). La paciente evoluciona tórpidamente (persistencia de fiebre, insuficiencia renal y deterioro progresivo de su conciencia), lo cual ameritó su traslado a la unidad de cuidados intensivos donde fallece el 21-09-2023.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inicialmente, se realizó el cultivo microbiológico de las muestras de secreción de herida, LCR e implantes de la paciente sometida a artrodesis cervical en medios de cultivos nutritivos y selectivos, aplicando pruebas bioquímicas de rutina para la identificación de los aislados bacterianos. Así mismo, se evaluó su antibiograma por la prueba de difusión y los métodos del *Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines* [19], reportando la susceptibilidad o resistencia a 14 antibióticos de siete clases: gliciliclinas (tigeciclina), aminoglicósidos (amikacina), β -lactámicos (amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam), monobactams (aztreonam), cefalosporinas (cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftazidime/avibactam y ceftolozano/tazobactam), fluoroquinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina), carbapenems (ertapenem) y trimetoprima/sulfametoxazol. Como prueba complementaria, se evaluó la presencia de carbapenemasas [20].

En relación a la MEB, se analizaron cuatro réplicas de los implantes de titanio extraídos de la paciente sujeta a artrodesis cervical C1-C5 (Fig. 3).

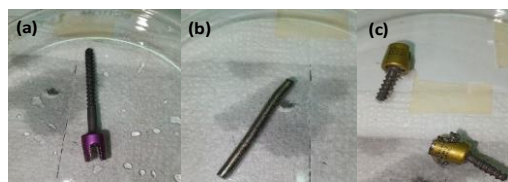


Fig. 3. Réplicas de implantes extraídos de la paciente. Tornillos transarticulares (a y b) y tornillos de masas laterales (c).

Estos implantes se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón salino fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,2) estéril y se conservaron a 4 °C hasta su observación por MEB. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada y

PBS estéril, en condiciones de esterilidad. Se realizó la deshidratación con etanol al 50%, se secó en estufa por 40 min, se cubrió con oro y se montó en pines porta muestras para observarlo en el microscopio FEI INSPECT F50 del Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología (CIMN), IVIC, operado a alto vacío con voltaje acelerador de 10 KV. Alrededor de 20-25 posiciones se evaluaron aleatoriamente en la superficie del tornillo (considerando áreas laterales, delantera y posterior) para obtener imágenes representativas de las biopelículas (Fig. 4).

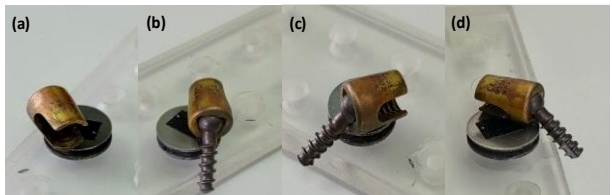


Fig. 4. Preparación y montaje de implantes para su observación por MEB. Vistas: Posterior (a), delantera (b), laterales (c y d).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo microbiológico en medios nutritivos y selectivos de las muestras de heridas, LCR e implantes, así como su posterior identificación bioquímica, reveló inicialmente infección por *K. pneumoniae* en la paciente sujeta a artrodesis cervical. Estos cultivos presentaron predominantemente colonias de morfología redondeada, mucosas, brillantes y coloración rosado pálido, características de esta especie bacteriana (Fig. 5).



Fig. 5. Aislamiento de *K. pneumoniae* a partir del cultivo de muestras de herida y LCR de paciente sometida a artrodesis cervical. En la parte inferior se muestra prueba de inmunoensayo con resultado positivo de producción de carbapenemasas (New Delhi, metallo-β-lactamase 1, NDM-1).

El antibiograma de los cultivos de *K. pneumoniae* mostró resistencia a 13 de los antibióticos evaluados de las familias de los aminoglicósidos, β-lactámicos, monobactámicos, cefalosporinas y fluoroquinolonas, mientras que solamente se encontró sensibilidad a la tigeciclina (Tabla 1). Adicionalmente, se realizó el ensayo de colistina por el método de elución de discos (macrométodo) reportándose como sensible (MIC: 2 ug/ml).

Tabla 1. Identificación de *K. pneumoniae* por cultivo microbiológico y antibiograma (técnica de difusión).

Antibiograma (ID cultivo: <i>K. pneumoniae</i>)	
Antibióticos	Resultado
Tigeciclina	Sensible
Amikacina	Resistente
Amoxicilina/clavulanato	
Aztreonam	
Cefepime	
Cefotaxima	
Ceftazidima	
Ceftazidima/avibactam	
Ceftolozano/tazobactam	
Ciprofloxacina	
Ertapenem	
Levofloxacina	
Piperacilina/tazobactam	
Trimetropima/sulfametoxazol	

La convergencia de la resistencia a los carbapenémicos y la hipervirulencia conduce a una alta mortalidad en pacientes con meningitis posoperatoria por *K. pneumoniae* [21]. El aislado de este patógeno identificado en muestras de la paciente en estudio, incluyendo los implantes, mostró producción de carbapenemasas del tipo NDM-1, capaces de hidrolizar casi todos los antibióticos β-lactámicos disponibles [22]. Esto limitó las opciones de tratamientos antibacterianos eficaces como el ceftazidime/avibactam [23], cuya disponibilidad es difícil en países de bajos-medios ingresos como Venezuela. Se ha reportado que la administración endovenosa e intrateca de colistina puede erradicar con éxito la meningitis por *K. pneumoniae* productora de NDM-1 [24]. Sin embargo, en este caso la paciente presentó persistencia de la infección durante el postoperatorio con múltiples episodios de meningitis complicadas con hidrocefalia. Como principales causas de recurrencia de esta infección, muy probablemente se encuentran la resistencia múltiple a antibióticos del patógeno y la contaminación de los implantes por biopelículas.

La MEB es considerada una poderosa herramienta para el estudio de las estructuras tridimensionales en las biopelículas. Particularmente, esta técnica ha demostrado gran utilidad para examinar biopelículas de múltiples especies bacterianas en prótesis dentales de titanio [25]. En este estudio, la evaluación por MEB de los implantes de titanio extraídos de la paciente en estudio permitió determinar que efectivamente estas superficies fueron colonizadas por biopelículas complejas con diferentes morfologías celulares y estructuras altamente organizadas embebidas en abundante producción de matriz extracelular, indicativas de las etapas más avanzadas de maduración y arquitectura (Fig. 6a). Además, en estas biopelículas se observaron formas celulares bacterianas semejantes a cocos y bacilos de aproximadamente 0,5-1

µm (Fig. 6b y 6c), posiblemente asociados a la infección por *K. pneumoniae*. En Latinoamérica y el Caribe, las bacterias gramnegativas representan los aislamientos nosocomiales más comunes. Las infecciones bacterianas más prevalentes son causadas por *Acinetobacter* spp. (26%), seguida por *Pseudomonas* spp. (18%) y *Klebsiella* spp. (9%). En Venezuela, para el año 2011 *A. baumannii* (16%) fue reportado entre los microorganismos más prevalentes causantes de infecciones nosocomiales, seguido por *K. pneumoniae* (18%), *P. aeruginosa* (13%) y *E. coli* (11%) [26-27].

Por otra parte, la morfología cocoide identificada colonizando la superficie de los implantes y formando parte de las biopelículas es sugestiva de la entrada al estado viable no cultivable (VNC). Este estado de latencia, supervivencia y patogenicidad bacteriana se ha descrito en esta especie y otras bacterias gramnegativas como un mecanismo que le permite al patógeno permanecer por periodos prolongados en biopelículas y causando infección al hospedador, resistiendo a su respuesta inmunológica y la acción de antibióticos [28]. En las figuras 6d, 6e y 6f se evidenciaron estructuras geométricas parecidas a cristales, probablemente de origen bacteriano con producción notoria de matriz de aspecto cristalino. Estas estructuras tridimensionales se han reportado formando parte de la arquitectura de las biopelículas como un mecanismo que también les confiere a las células bacterianas mayor protección contra la acción de los antibióticos y respuesta inmunológica del hospedador [29]. Finalmente, nuestros resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado el desarrollo *in vitro* de biopelículas bacterianas en prótesis óseas de titanio presentando un número elevado de agregados celulares, crecimiento y arquitectura de biopelículas [16-18, 25].

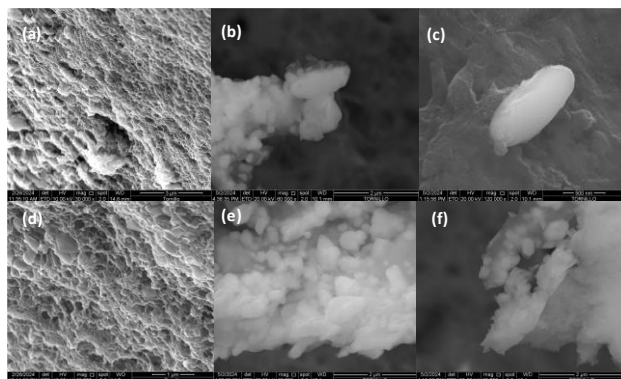


Fig. 6. Imágenes representativas de MEB que demuestran la formación de biopelículas en implantes de titanio. Biopelículas con diferentes morfologías celulares y estructuras embebidas en matriz extracelular (a-f). Células semejantes a cocos y bacilos (b y c). Estructuras geométricas semejantes a cristales con formas rectangulares, ovóides, circulares y hexagonales (b, e y f).

CONCLUSIONES

Esta investigación constituye el primer reporte que evidencia por MEB la formación de biopelículas en implantes de titanio asociados a cuadro clínico de múltiple infección y resistencia a antibióticos. La MEB ofrece gran utilidad en el diagnóstico clínico de las biopelículas asociadas a implantes óseos. Sin embargo, se recomienda para futuros estudios el empleo de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), la cual por sus características de trabajo con vapor de agua mantiene las estructuras celulares de las biopelículas sin generar daños morfológicos, evitando la formación de posibles artefactos. La aplicación del ESEM permitiría descartar probables artefactos formados en las biopelículas y confirmar *in situ* las estructuras bacterianas observadas en estas muestras de implantes de titanio. Adicionalmente, se recomienda complementar el análisis elemental de los cristales y estructuras tridimensionales determinadas en las biopelículas por Espectroscopia de energía dispersiva (EDX).

REFERENCIAS

- [1] Alotaibi G.F., Bukhari M. (2020) "Factors influencing bacterial biofilm formation and development" *American Journal of Biomedical Research* 12:6.
- [2] Al-Tayawi T.S., Adel E.M., Omer F.H. (2023) "An overview of biofilm as a virulence factor for bacteria to survive in the harsh environment" *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies* 3:1188-1197.
- [3] Abebe G.M. (2020) "The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination" *International Journal of Microbiology* 2020: 1705814.
- [4] Bera J.H., Raj-A L.S., Gang S., Patel D.N. (2023) "Biofilm: a threat to medical devices". En: *Microbial Biofilms* Rajasthan, Academic Press, pp. 369-390.
- [5] Gupta P., Pruthi P.A., Pruthi V. (2019) "Role of exopolysaccharides in biofilm formation" *ACS Symposium Series* 1323:17-57.
- [6] Sharma D., Misba L., Khan A.U. (2019) "Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities" *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 8:76.
- [7] Singh S., Datta S., Narayanan K.B., Rajnish N. (2021) "Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments" *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19:140.
- [8] Rodrigues M.E., Gomez F., Rodrigues C.F. (2019) "Candida spp./bacteria mixed biofilms". *Journal of Fungi* 6:5.
- [9] Zhao A., Sun J., Liu Y. (2023) "Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment

- strategies” *Frontiers Cellular and Infection Microbiology* 13:1137947.
- [10] Navarrete J., Pinilla G., Muñoz L. (2021) “Formación de biopelícula como mecanismo de persistencia y resistencia bacteriana”. 1era ed. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. p. 118.
- [11] Singh A., Amod A., Pandey P., Bose P., Pingali M.S., Shivalkar S., Varadwaj P.K., Sahoo A.K., Samanta S.K. (2022) “Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies” *Biomedical Materials* 17:022003.
- [12] Centeleghe I., Norville P., Hughes L., Maillard J-Y. (2023) “*Klebsiella pneumoniae* survives on surfaces as a dry biofilm” *American Journal of Infection Control* 51:1157–1162.
- [13] Nouri A., Wen C. (2021) “*Stainless steels in orthopedics*”. En *Structural Biomaterials: properties, characteristics, and selection* Melbourne, Woodhead Publishing, pp. 67-101.
- [14] Krischak G. D., Gebhard F., Mohr W., Krivan V., Ignatius A., Beck A., Wachter N.J., Reuter P., Arand M., Kinzl L., Claes L.E. (2004) “Difference in metallic wear distribution released from commercially pure titanium compared with stainless steel plates” *Archives of Orthopedic and Trauma Surgery* 124:104-113.
- [15] Ríos-Puerta K., Gutiérrez-Flores O.D. (2022) “Aleaciones metálicas para aplicaciones ortopédicas: una revisión sobre su respuesta al estrés fisiológico y a los procesos de corrosión” *Revista Politécnica* 18:24-39.
- [16] Camacho-Alonso F., Salinas J., Sánchez-Siles M., Pato-Mourelo J., Cotrina Veizaga B.D., Ortega N. (2021) “Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and chitosan on the titanium-adherent biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study” *Journal of Periodontology* 93:104-115.
- [17] Sarfraz S., Mantinen P., Laurila M., Suojanen J., Saarnio J., Rossi S., Horelli J., Kaakinen M., Likola J., Raunanan J. (2022) “Effect of surface tooling techniques of medical titanium implants on bacterial biofilm formation in vitro” *Materials* 15:3228.
- [18] Gutiérrez A.V., Fernández-Delgado, M., González G., Salazar V. (2017) “Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms evaluated by scanning electron microscopy on materials proposed for bone prostheses” *Acta Microscopica* 26:125-126.
- [19] Lewis J.S., Mathers A.J., Bobenchik A.M., Bryson A.L., Campeau S., Cullen S.K., Dinglei T., Galas M.F., Humphriesn R.M., Kim T.J. (2024) “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing” *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 44:382.
- [20] Lewis J.S., Weinstein M.P., Bobenchik A.M., Campeau S., Cullen S.K., Dinglei T., Galas M.F., Humphriesn R.M. (2023) “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing” *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 43:357.
- [21] Li Y., Hu D., Ma X., Li D., Tian D., Gong Y., Jiang X. (2021) “Convergence of carbapenem resistance and hypervirulence leads to high mortality in patients with postoperative *Klebsiella pneumoniae* meningitis” *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 27:95-100.
- [22] Linciano P., Cendron L., Gianquinto E., Spyarakis F., Tondi D. (2019) “Ten Years with New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): from structural insights to inhibitor design” *ACS Infectious Diseases* 5:9–34.
- [23] Bocanegra-Ibarias P., Camacho-Ortiz A., Garza-González E., Flores-Treviño S., Kim H., Perez-Alba E. (2020) “Aztreonam plus ceftazidime-avibactam as treatment of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in a neutropenic patient: Last resort therapy?” *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 23:417-419.
- [24] Inamasu J., Ishikawa K., Oheda M., Nakae S., Hirose Y., Yoshida S. (2016) “Intrathecal administration of colistin for meningitis due to New Delhi metallo- β -lactamase 1(NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae*” *Journal of Infection and Chemotherapy* 22:184-186.
- [25] Hussain B., Simm R., Bueno J., Giannettou S., Naemi A., Lyngstadaas S.P., Haugen H.J. (2024) “Biofouling on titanium implants: a novel formulation of poloxamer and peroxide for *in situ* removal of pellicle and multi-species oral biofilm” *Regenerative Biomaterials* 11:014.
- [26] Luna C.M., Rodríguez-Noriega E., Bavestrello L., Guzmán-Blanco M. (2014) “Gram-negative infections in adult intensive care units of latin america and the Caribbean” *Critical Care Research and Practice* 2014:12.
- [27] Rosenthal V.D., Chaparro G.J., Servolo-Medeiros E.A., Souza-Fram D., Escudero D., Gualtero-Trujillo S.M., Morfin-Otero R., Gonzalez-Diaz E., Rodriguez-Noriega E., Altuzar-Figueroa M.A. (2021) “An eight-year multicenter study on short-term peripheral intravenous catheter-related bloodstream infection rates in 100 intensive care units of 9 countries in Latin America: Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Ecuador, Mexico, Panama, and Venezuela. Findings of the International Nosocomial

- Infection Control Consortium (INICC) *Infection Control Hospital Epidemiology* 42:1098-1104.
- [28] Jiménez-Moleón M.C., Solano-Gómez J.A. (2022) “Bacterias viables pero no cultivables y sus implicaciones para la seguridad microbiológica” *Revista abierta Biología ambiental* 7:014-016.
- [29] Más bien M.A., Gupta K., Mandal M. (2021) “Biopelícula microbiana: formación, arquitectura, resistencia a los antibióticos y estrategias de control” *Revista Brasileña de Microbiología* 52:1701-1718.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Lisbeth Losada del CIMN (IVIC) por su valiosa asistencia en la preparación de las muestras.