



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“Tipificación molecular de *Staphylococcus epidermidis*  
causantes de infecciones asociadas a la atención de la salud  
en hospitales de Acapulco, Guerrero”

## T E S I S

Para obtener el grado de:  
**Maestría en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

**IBQ. David Alejandro Torres Añorve**

**Directora de tesis: Dra. Natividad Castro Alarcón**

**Codirectora: Dra. Verónica Irazú Martínez Santos**

**Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. Enero de 2019**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 19 días del mes de junio de dos mil dieciocho se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "**Tipificación molecular de *Staphylococcus epidermidis* causantes de infecciones asociadas a la atención de la salud en hospitales de Acapulco Guerrero**", presentada por el alumno David Alejandro Torres Añorve, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón  
Dirección de tesis

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares


Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dra. Irma Gabriela Echániz Avilés

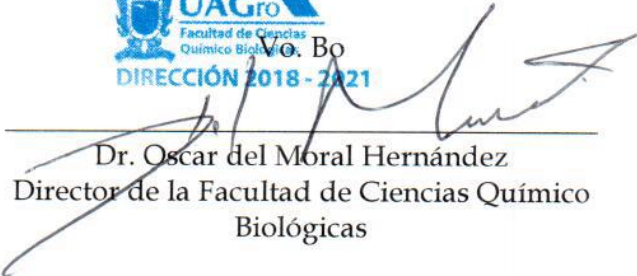
Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
 **UAGro**  
Coordinación del Posgrado de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Coordinación 2014-2018

 **UAGro**  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas  
Vo. Bo  
DIRECCIÓN 2018 - 2021



Dr. Oscar del Moral Hernández  
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación en Microbiología de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Natividad Castro Alarcón

La co-dirección de:

Dra. Verónica Irazú Martínez Santos

La asesoría de:

Dra. Olga Lilia Garíbay Cerdaneres

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dra. Irma Gabriela Echániz Avilés

Esta investigación recibió el financiamiento de FOMIX-CONACyT-GUERRERO, con clave de proyecto 249719, para estancia de investigación en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (del 8 al 28 de junio de 2017).

Durante el periodo en que se cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. David Alejandro Torres Añorve recibió la beca del CONACYT con Número de CVU 625756 (del 1 de septiembre del 2016 al 31 de agosto del 2018).

## Agradecimientos

Un especial agradecimiento a la Dra. Natividad Castro Alarcón, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, así como compartir conmigo sus conocimientos y apoyo incondicional durante estos años.

De igual manera, a la Dra. Verónica Irazú Martínez Santos por su dedicación y sinfín de ayuda tanto en el escrito como en el laboratorio, que volvió ameno el trabajo diario.

A mis sinodales, por las sugerencias y aportaciones realizadas, sin los cuales no sería posible la culminación de este proyecto: a la Dra. Olga Lilia Garíbay Cerdaneres por sus recomendaciones, las cuales no se limitaron a lo académico; a la Dra. Isela Parra Rojas, por todas las atenciones otorgadas; y al Dr. Lorenzo Salgado Goytia por sus valiosas propuestas.

Mi más estimable agradecimiento a la Dra. Irma Gabriela Echániz Avilés y su maravilloso equipo de trabajo, particularmente a la Dra. Maria Elena Velazquez Meza por su asesoramiento, con quienes tuve la dicha de realizar una estancia indispensable para llevar a cabo la tesis.

A las personas del ISSSTE de Chilpancingo y Hospital Vicente Guerrero de Acapulco que contribuyeron a este logro.

A mis colegas del laboratorio de Investigación en Microbiología, a quienes considero colegas más por la relación de amistad que por la profesión compartida. A mis compañeros del posgrado con quienes compartí valiosas experiencias. Al personal de la Universidad Autónoma de Guerrero, por facilitar día a día las actividades académicas. A todas las amistades surgidas durante esta etapa y aquellas otras que relucieron durante este periodo. Un afectuoso agradecimiento a la M.C. Dulce Elena Silva Silverio, por hacer más placentera mi vida.

Por su esencial compañía durante toda mi existencia, un apreciable agradecimiento a mi familia y Dios.

Gracias a todos, porque no considero este trabajo propio, sino como el resultado del esfuerzo conjunto de un grandioso equipo.

*“Todavía hay esperanza, cuando nos enfrentamos sin prejuicios a un problema sin solucionar. Sin embargo, no hay esperanza si actuamos como si el problema no existiese.”*

# ÍNDICE

	Págs.
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Generalidades de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	3
2. Epidemiología .....	4
3. Factores de virulencia .....	5
4. Resistencia a antibióticos.....	5
5. Tipificación molecular.....	8
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
V. JUSTIFICACIÓN.....	12
VI. HIPÓTESIS .....	13
VII. OBJETIVOS .....	14
VIII.MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
IX. RESULTADOS .....	21
1. Identificación de cepas.....	21
2. Tipificación de secuencias multilocus .....	23
3. Relaciones clonales de <i>S. epidermidis</i> .....	25
4. Producción de “biofilm” .....	26
X. DISCUSIÓN.....	28
XI. CONCLUSIONES.....	32
XII. ANEXOS.....	33
XIII.REFERENCIAS .....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para PCR dúplex y MLST.....	17
Tabla 2. Perfil de resistencia a antibióticos.....	22
Tabla 3. Resumen de resultados de MLST.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
Fig. 1. PCR dúplex.....	23
Fig. 2. Diagrama eBURST.....	26
Fig. 3. Producción de biofilm.....	27

## I. RESUMEN

**Introducción:** *Staphylococcus epidermidis* ha sido considerado en años recientes como causante importante y frecuente de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), teniendo como consecuencia un aumento en los costos de hospitalización, morbilidad y mortalidad. Adicionalmente, la resistencia a antibióticos y la producción de “biofilm” son obstáculos importantes para el tratamiento de las infecciones por este organismo. En hospitales de la ciudad de Acapulco del estado de Guerrero, México, se han aislado *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina causantes de IAAS; sin embargo, se desconoce si estas infecciones son producidas por clonas relacionadas genéticamente. **Materiales y métodos:** Se analizaron 20 cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina y causantes de IAAS por bacteriemia. La identificación y resistencia a antibióticos se realizó mediante Vitek®2 (bioMérieux), la identificación y resistencia a meticilina se confirmó mediante una PCR dúplex de los genes *mecA* y *nuc*. Posteriormente se evaluó la producción de biofilm y determinó su origen clonal mediante el método de tipificación de secuencia multilocus (MLST por sus siglas en inglés). **Resultados:** Se encontraron 14 perfiles de resistencia a antibióticos y 13 secuencias tipo (ST) diferentes, de las cuales la ST 761 es una nueva ST. Las ST 2 y 23 fueron las más predominantes con 4 cepas cada una, siendo junto con la ST 135 las que presentan resistencia a mayor cantidad de antibióticos. De las cepas analizadas, la mitad fueron no productoras y la otra mitad débiles productoras de “biofilm”. **Conclusión:** Las clonas de *S. epidermidis* están relacionadas genéticamente y simultáneamente su población está evolucionando. Además, la abundante producción de “biofilm” podría no ser esencial durante toda la infección.

**Palabras clave:** *Staphylococcus epidermidis*, IAAS, bacteremia, MLST.

## II. ABSTRACT

**Introduction:** *Staphylococcus epidermidis* has been considered in recent years an important and frequent cause of healthcare-associated infections (HAIs), resulting in an increase in hospitalization costs, morbidity and mortality. Additionally, resistance to antibiotics and the production of biofilm are major obstacles for treatment of infections by this organism. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* HAIs-causing have been isolated in hospitals of the city of Acapulco in the state of Guerrero, Mexico; however, it is unknown whether genetically related clones cause these infections. **Material and methods:** We analyzed 20 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* of bacteremia HAIs-causing. The identification and resistance to antibiotics was performed by Vitek®2 (bioMérieux), the identification and resistance to methicillin was confirmed by duplex PCR of *mecA* and *nuc* genes. Subsequently, we evaluated the biofilm production and determined the clonal origin by multilocus sequence typing (MLST). **Results:** We found 14 profiles of antibiotic resistance and 13 sequences type (ST), of which ST 761 is a new ST; ST 2 and 23 were the most prevalent strains with four each. ST 2, 23 and 135 were resistant to higher diversity of antibiotics. The half of the strains tested were non-biofilm producers and the other weak biofilm producers. **Conclusion:** *S. epidermidis* clones are genetically related and simultaneously their population is evolving. In addition, the abundant production of biofilm may not be essential throughout the infection.

**Key words:** *Staphylococcus epidermidis*, HAIs, bacteremia, MLST.



### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. Generalidades de *Staphylococcus epidermidis*

Los estafilococos son bacterias muy comunes y persistentes en la piel humana que pertenecen al género *Staphylococcus*. Este género incluye al menos 40 especies, dentro de las cuales se encuentra *S. epidermidis*, el cual es un estafilococo coagulasa negativo (ECN), Gram positivo, anaerobio facultativo, carente de flagelos, que se asocia irregularmente formando estructuras parecidas a racimos de uvas, no produce esporas y rara vez presenta cápsula, además de contar con una gruesa pared celular rica en peptidoglucano que cubre a la membrana citoplasmática (Namvar *et al.*, 2014). Esta bacteria posee la capacidad de colonizar a diversos organismos, entre ellos a los humanos (Chaudhry y Patil, 2016; Misic *et al.*, 2016), donde no sólo contribuye a la diversidad de comunidades microbiológicas (Stacy *et al.*, 2016), sino que también confiere mecanismos de defensa contra virus (Chen *et al.*, 2016) y otras bacterias (Ong y Leung, 2016).

A pesar de poder existir este microorganismo de forma inocua en la piel humana, en los últimos años se ha convertido y proliferado como responsable de infecciones causadas generalmente en pacientes inmunocomprometidos, como personas de edad avanzada, de nacimiento prematuro, con inmunodeficiencia, quemaduras graves, desnutrición severa o diabetes mellitus, por lo cual es considerado un patógeno oportunista. Las infecciones ocasionadas por esta bacteria son más comunes en pacientes hospitalizados, lo que le ha valido para que en recientes años sea considerado como causante importante y frecuente de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), anteriormente denominadas infecciones nosocomiales u hospitalarias (Gomes *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2009; Schoenfelder *et al.*, 2010).

La red hospitalaria de vigilancia epidemiológica (RHOVE) en México, define a las IAAS como una condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o su toxina, que no estaba presente o en periodo de incubación en el momento del ingreso del paciente a la unidad de atención a la salud o antes de recibir atención sanitaria, y que puede manifestarse incluso después de su egreso (RHOVE, 2016).

## 2. Epidemiología

Las IAAS ocasionadas por *S. epidermidis* se han relacionado con la utilización de prácticamente cualquier tipo de dispositivo médico, entre los que destaca el catéter. En este sentido, las infecciones asociadas con *S. epidermidis* son: sepsis neonatal y en adultos inmunocomprometidos, llegando a ocasionar la muerte (Dong y Speer, 2014); patogénesis de eccema atópica en niños (Marrs y Flohr, 2016; Hon *et al.*, 2016); y endoftalmítis, pudiendo ocasionar la pérdida irreversible de la visión (Flores-Paez *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). *S. epidermidis* no sólo provoca infecciones por sí sola, sino que puede actuar en conjunto con otras bacterias, por ejemplo, contribuye con *Pseudomonas aeruginosa* a la patogénesis de la neumonía asociada a ventilación (Hotterbeekx *et al.*, 2016) y bacteriemia; junto con *S. aureus*, son las principales especies encontradas en infecciones relacionadas con dispositivo ortopédico (Deplano *et al.*, 2016; Morgenstern *et al.*, 2016).

Dichas infecciones cobran relevancia al aumentar la morbilidad y mortalidad, lo que conlleva a un aumento en los costos de atención, días de hospitalización y años de vida ajustados por discapacidad (DALYS, por sus siglas en inglés) en la población (Chessa *et al.*, 2015; Schoenfelder *et al.*, 2010). Así, en Norteamérica y Europa entre el 5 y 10% de todas las hospitalizaciones conllevan a una IAAS, mientras que este porcentaje aumenta hasta un 40% en América Latina, África Subsahariana y Asia. En México la Secretaría de Salud encontró una prevalencia del 21% en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud (Chessa *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2015; RHOVE, 2016).

Para hacer frente a la problemática planteada, se han dispuesto diversas estrategias que consisten en mejorar la vigilancia epidemiológica, fortaleciendo los sistemas de identificación del patógeno y comunicación entre las instituciones responsables, y aplicar adecuadamente las medidas de prevención correspondientes, tales como las medidas de higiene del personal hospitalario entre otras (Fernando *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2015; RHOVE, 2016). Sin embargo, el control de las IAAS se dificulta debido a la presión selectiva ejercida por antimicrobianos, limitando las opciones de tratamiento (Gomes *et al.*, 2013; Khan y Khan, 2016).

Así, *S. epidermidis* emerge en los últimos años como un patógeno importante que, en conjunto con las implicaciones económicas, puntualizan la importancia de su estudio, así como de sus factores de virulencia y de resistencia a antibióticos para mejorar los tratamientos (Davenport *et al.*, 2014).

### **3. Factores de virulencia**

Los mecanismos por los cuales *S. epidermidis* provoca enfermedades son muy variados. Entre los factores de virulencia que posee están: las modulinas solubles en fenol (PSMs), la proteína de unión a matriz extracelular (Embp), proteasas como ClpP y SepA, entre otros (Namvar *et al.*, 2014); además de los más significativos que son: el ácido poli- $\gamma$ -glutámico, que es secretado por la bacteria, cubriéndola y protegiéndola de péptidos antimicrobianos y neutrófilos, y de altas concentraciones de sales en el ambiente (Kocianova *et al.*, 2005); el polisacárido de adhesión intercelular (PIA), también llamado poli-N-acetilglucosamina (PNAG), el cual es de suma importancia para la virulencia, evasión de la respuesta inmune y formación de “biofilm” o biopelículas (Mirzaei *et al.*, 2016; Spiliopoulou *et al.*, 2012).

El “biofilm” está formado por una comunidad microbiana, generalmente heterogénea, encapsulada dentro de una matriz exopolimérica unida a una superficie, que varía de acuerdo con el sustrato, adhesinas y los materiales de matriz disponibles (Paharik y Horswill, 2016). Su proceso de desarrollo está dividido en tres etapas: la unión inicial, la acumulación o maduración y el desprendimiento o dispersión; una cuarta etapa considerada por algunos autores es la formación de una microcolonia, la cual se ubicaría entre la primera y segunda etapa (Dong y Speer, 2014; Paharik y Horswill, 2016). Lo anterior promueve una alta resistencia mecánica y metabólica contra antibióticos e incluso quimioterapéuticos, mediante polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas (Sahal y Bilkay, 2014); además, facilita el intercambio de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Cabrera-Contreras *et al.*, 2013).

### **4. Resistencia a antibióticos**

La resistencia a antibióticos en las bacterias se ha vuelto un problema de salud a nivel mundial al disminuir su eficiencia para combatir infecciones, lo que fuerza al desarrollo de nuevos antibióticos y a la comprensión de los mecanismos de dicha

resistencia (Khan, 2016), entre los que se encuentran los de *S. epidermidis* (Farid *et al.*, 2015).

Los antibióticos sugeridos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (2017) para utilizarse en forma rutinaria en el laboratorio contra *S. epidermidis* son: azitromicina, claritromicina, eritromicina, clindamicina, oxacilina, cefoxitina, penicilina y trimetoprima/sulfametoxazol. Sin embargo, cuando existe una infección polimicrobiana que involucra sitios múltiples, en casos de alergia al medicamento, intolerancia o falta de respuesta a los antibióticos antes mencionados, se puede optar por ceftarolina, daptomicina, linezolid, tedizolid, doxiciclina, minociclina, tetraciclina, vancomicina y rifampicina. Otros antibióticos alternativos o complementarios que se utilizan cuando existe resistencia a varios de los medicamentos primarios, en pacientes alérgicos a otros medicamentos o para reportarse como ayuda al control epidemiológico son: ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, gentamicina, oritavancina y telavancina. Adicionalmente, en caso de infecciones urinarias se opta por nitrofurantoina, sulfisoxazol o trimetoprima; mientras que para infecciones oculares se recomienda el cloranfenicol (CLSI, 2017).

Se ha demostrado que *S. epidermidis* puede intercambiar genes entre distintas cepas e incluso con diferentes especies, como *S. aureus*, permitiendo compartir genes de resistencia a diversos antibióticos y de toxicidad por metales, además de genes involucrados en la patogenicidad (Meric *et al.*, 2015). La transferencia horizontal de genes no es la causa exclusiva de la resistencia a antibióticos, ya que ésta se puede deber de igual manera a mutaciones espontáneas que aumenten la expresión de genes involucrados en la resistencia a los antibióticos, o bien modifiquen el blanco del antibiótico o su nivel de expresión. Por si no fuera poco, esto puede provocar el aumento o disminución de la resistencia a otro antibiótico (Baym *et al.*, 2016).

Una de las maneras en que se realiza la transferencia horizontal de genes es mediante los elementos genéticos móviles, que son elementos de DNA capaces de trasladarse e insertarse de un lugar a otro dentro del DNA, los cuales son transferidos entre bacterias, resultando riesgoso si se les relaciona con resistencia a antibióticos (Ray *et al.*, 2016).

Algunos elementos móviles comunes en *S. epidermidis* son: el elemento móvil catabólico de arginina (ACME) y el casete cromosómico estafilocócico (SCC). El elemento ACME es una isla genómica formada por dos principales grupos de genes, el grupo *arc* y el grupo *opp3*, que se clasifica de acuerdo con la presencia y/o ausencia de dichos grupos. Este elemento promueve la capacidad de colonización y mejora de la adaptabilidad al hospedero, por ejemplo, mejorando la tolerancia a ambientes ácidos como la piel humana al favorecer la producción de amoníaco. Se identificó por primera vez en una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina, debido a su localización adyacente al elemento *SCCmec* que contiene el gen *mecA* responsable de resistencia a meticilina (Onishi *et al.*, 2013).

Se denomina *SCCmec* a aquellos elementos que poseen el gen *mecA* y el gen para la recombinasa del casete cromosómico (*ccr*). De acuerdo con su contenido genético y su estructura, se han identificado trece tipos de *SCCmec* diferentes al día de hoy, según lo establecido por el “International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements” (Baig *et al.*, 2018; IWG-SCC, 2009). Además, poseen regiones hipervariables (HVR), las cuales se han identificado en aislados clínicos de varios pacientes (Havaei *et al.*, 2015; Najjar-Peerayeh *et al.*, 2016).

Por otra parte, los diferentes tipos de antibióticos a los que presentan resistencia las bacterias Gram positivas son los glucopéptidos, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, quinolonas, y principalmente betalactámicos.

Dentro del grupo de los betalactámicos encontramos a la penicilina, nafcilina, oxacilina, ampicilina, cefalosporinas y meticilina. El mecanismo de acción de los betalactámicos es mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, mientras que la resistencia a éstos es mediada principalmente por el gen *mecA*. Este gen codifica para la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2A), la cual presenta baja afinidad a antibióticos betalactámicos e interviene en la síntesis de peptidoglucano (Cabrera-Contreras *et al.*, 2013; Najjar-Peerayeh *et al.*, 2016). Adicionalmente, la expresión del gen *mecA* es regulada por las proteínas MecR1 y MecI (IWG-SCC, 2009).

La vigilancia epidemiológica de la resistencia a estos antimicrobianos, puntualmente meticilina, ha sido relevante debido a que se encuentra muy extendida en infecciones por estafilococos que generalmente poseen también resistencia a otros antibióticos, limitando así las opciones terapéuticas, además de ser un factor de riesgo de mortalidad en casos de bacteriemia, y encontrarse en 75% al 90% de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de infecciones hospitalarias (Chessa *et al.*, 2015; Weis *et al.*, 2015).

## **5. Tipificación molecular**

Como se mencionó anteriormente, las IAAS son un serio problema, principalmente con aquellos patógenos que presentan resistencia a múltiples antibióticos, siendo de enorme utilidad y relevancia un diagnóstico rápido (Gostev *et al.*, 2017; Widerstrom *et al.*, 2016). Por lo cual, la identificación y el diagnóstico de bacterias ha mejorado con el paso del tiempo, desde la utilización de métodos fenotípicos tradicionales, hasta los genotípicos actuales (Namvar *et al.*, 2014). Kleinschmidt y colaboradores (2015) destacan entre los métodos actuales de identificación los de pruebas bioquímicas disponibles en tarjetas o placas que son procesadas mediante una plataforma basada en instrumentos automatizados, tales como el Vitek 2 systems (bioMérieux), Phoenix Automated Systems (BectonDickinson Diagnostic System) y el Microscan Systems (Siemens Healthcare); la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés); y la secuenciación del gen *tuf* y 16S rRNA. Estas metodologías, son útiles para diferenciar entre patógenos de distintas especies, pero son muy limitadas para la diferenciación entre aquellos de la misma especie; para esto último se recurre a los métodos de genotipificación o tipificación molecular.

La tipificación molecular permite no sólo reconocer cepas virulentas, sino también determinar brotes de infecciones, inferir su procedencia, identificar transmisiones cruzadas, detectar fuentes de infecciones y, en el caso de algunos microorganismos, dar seguimiento a programas de vacunación (Doudoulakakis *et al.*, 2017; Gostev *et al.*, 2017; Sullivan *et al.*, 2005).

Al día de hoy, además del análisis del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés), la electroforesis en gel de campos pulsados, el número variable de múltiples

locus de repetición de DNA en tándem y la tipificación de secuencia multilocus (PFGE, MLVA y MLST por sus siglas en inglés, respectivamente) son los principales métodos utilizados para tipificar a *S. epidermidis*.

El método de PFGE es utilizado en la investigación de brotes de *S. epidermidis* en hospitales de todo el mundo (Saffari *et al.*, 2016), se basa en la restricción con endonucleasas de más del 90% de DNA cromosomal que posteriormente es separado por electroforesis; sus principales limitaciones son el tiempo empleado, la complicada reproducibilidad y la interpretación subjetiva entre varios aislados (Widerstrom *et al.*, 2012; Goering y Fey, 2014; Miragaia *et al.*, 2008).

Por otra parte, el MLVA se basa en la clasificación de cepas de acuerdo con el número de repeticiones cortas en tándem en genes codificantes y no codificantes dentro de los *loci* definidos, teniendo como limitaciones la falta de criterios interpretativos validados, ausencia de nomenclatura estándar y que el poder discriminatorio de MLVA aún no se ha demostrado para *S. epidermidis* (Widerstrom *et al.*, 2012).

Finalmente, además de permitir diferenciar entre las mismas especies bacterianas, el MLST resulta adecuado para predecir relaciones evolutivas a largo plazo, basándose en la identificación directa de variaciones de la secuencia nucleotídica de genes específicos altamente conservados (“housekeeping”). El esquema para *S. epidermidis* consta de siete genes, a los que se les proporciona un número de alelo para cada una de las secuencias únicas, con lo que se asigna una secuencia tipo (“sequence type”, ST) por cada perfil alélico de los siete genes (Saffari *et al.*, 2016; Thomas y Robinson, 2014). Esta información es almacenada en una base de datos curada, permitiendo comparar los perfiles alélicos obtenidos con los almacenados en la base de datos; aun así, el MLST también posee limitaciones, tales como el tiempo y costo requerido (Thomas y Robinson, 2014).

Para tipificar a *S. epidermidis* se han descrito diferentes esquemas por MLST que difieren en los genes analizados (Du *et al.*, 2013; Miragaia *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2014); sin embargo, el único que se ha demostrado que posee una adecuada resolución y poder discriminatorio para estudios de epidemiología, es el reportado

por Thomas *et al* (2007), el cual emplea los genes *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA* y *yqiL*.

Actualmente se encuentran reportadas en la base de datos del MLST (<https://pubmlst.org/sepidermidis>) 839 secuencias tipo (ST) diferentes de *S. epidermidis* alrededor del mundo, que pertenecen a bacterias recolectadas a partir de la década de 1970. En México se han encontrado varias ST, entre ellas las ST 2, 23, 46, 49, 61, 71 y 82 han sido reportadas en la base de datos del MLST por Miragaia y colaboradores (2007). Adicionalmente también se han encontrado otras ST en México, pero sin ser reportadas en la base de datos del MLST, estas son las ST 2, 7 y 23 procedentes de infección sanguínea (Martínez-Meléndez *et al.*, 2016); las ST 2, 4, 9, 10, 16, 21, 23, 26, 38, 43, 46, 48, 57, 71 y 87 procedentes de infección ocular; así como las ST 2, 4, 5, 9, 10, 23, 26, 43, 48, 118, 135, 173, 238 y 494 de conjuntiva sana y ST 2, 9 y 6 de piel sana (Flores-Páez *et al.*, 2015; Juárez-Verdayes *et al.*, 2013).

Las ST se agrupan en complejos clonales (CC) y sus nomenclaturas derivan de la ST fundadora predicha para dicho CC. Así, el complejo clonal 2 (CC2) representa casi el 74% de todas las cepas del mundo, teniendo a la ST2 como fundadora predictora con el 31% de las cepas mundiales (Miragaia *et al.*, 2007). Adicionalmente, se han relacionado los diversos CC con los tipos de *SCCmec*; con lo cual, se ha observado que los *SCCmec* son adquiridos frecuentemente por las diversas cepas de *S. epidermidis*, pero preferentemente por las pertenecientes al CC2 (Miragaia *et al.*, 2007). Lo anterior ha servido para observar la propagación de clonas entre distintas fechas y lugares; como lo realizado por Layer y colaboradores (2018), quienes evidencian durante un brote de *S. epidermidis* resistente a linezolid la diseminación multiclonal del CC5 a partir de aislados clínicos. Por lo tanto, *S. epidermidis* es considerado como un reservorio de genes de resistencia, que adicionalmente, pueden ser transferidos a *S. aureus* (Wisplinghoff *et al.*, 2003).



#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Los aislados de *S. epidermidis* causantes de infecciones en hospitales de la ciudad de Acapulco se originaron por la propagación de una clona predominante?

## V. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones asociadas a la atención en la salud en hospitales públicos alcanzan una frecuencia del 21%, y son una de las principales causas de morbilidad en pacientes de alto riesgo, como personas de edad avanzada, de nacimiento prematuro, con inmunodeficiencia, quemaduras graves, desnutrición severa o diabetes mellitus.

Estas infecciones se presentan debido al uso de procesos médicos invasivos que favorecen la capacidad de los microorganismos de infectar y superar los mecanismos de defensa del hospedero. Uno de los principales microorganismos con dichas características y causante de una gran variedad de patologías es *S. epidermidis*, que ocasiona eccema atópico, bacteriemia, endoftalmitis, sepsis neonatal, infección por catéter, entre otras. Sin embargo, es escasa la investigación y vigilancia epidemiológica a nivel nacional de dicha bacteria.

Debido a su importancia, se debe poner principal atención a los hospitales, porque pueden ser reservorios de patógenos con resistencia a antibióticos, y que por la deficiente implementación de los adecuados procesos de higiene se propicie su diseminación a la comunidad. Esto conlleva a implicaciones económicas y pérdidas humanas, que pueden ser fácilmente prevenibles con un mejor control de la enfermedad.

Por consiguiente, no es suficiente con identificar el género y especie del patógeno para controlar futuras infecciones, sino que es primordial diferenciar entre clones y conocer factores de virulencia que poseen, la procedencia de brotes, así como los lugares, fechas y formas de propagación. Por lo tanto, se vuelve fundamental la tipificación para determinar las medidas de acción a tomar por las autoridades correspondientes con base a un panorama más amplio por el personal hospitalario y autoridades correspondientes.

## VI. HIPÓTESIS

Los aislados clínicos de *S. epidermidis* causantes de infecciones en hospitales de la ciudad de Acapulco están relacionados genéticamente en complejos clonales.

## VII. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Analizar el origen clonal de los aislamientos de *S. epidermidis* responsables de infecciones asociadas a la atención a salud en el Hospital General (SS) y el Hospital Vicente Guerrero (IMSS) de Acapulco.

### Objetivos específicos

- Identificar fenotípicamente los aislamientos clínicos de *S. epidermidis* causantes de IAAS y evaluar su perfil de resistencia a antibióticos.
- Identificar genotípicamente los aislamientos clínicos de *S. epidermidis* causantes de IAAS y la presencia del gen *mecA*.
- Determinar las secuencias tipo de las cepas de *S. epidermidis* responsables de IAAS en los hospitales de Acapulco.
- Evaluar la producción de “biofilm” en las cepas de *S. epidermidis* y su relación con las secuencias tipo.
- Definir el origen clonal de las secuencias tipo de *S. epidermidis*.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño de estudio.** Se realizó un estudio observacional transversal, en el cual se recolectaron muestras aisladas de infecciones en hospitales de la ciudad Acapulco, Guerrero, por orden del médico, bajo las normas y criterios del hospital e identificadas como estafilococos por personal competente. Se utilizaron únicamente datos como sitio y fecha de aislamiento, pero los datos personales de los pacientes fueron anonimizados desde que se obtuvieron las muestras para el estudio. Los experimentos se realizaron en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

**Recolección y recuperación de muestras.** Se recolectaron un total de 73 cepas de *S. epidermidis* aisladas de infecciones en hospitales, de las cuales se seleccionaron aquellas con resistencia a metilina y procedentes de hemocultivos, quedándonos con 20 cepas. Del total de las 73 cepas, 59 fueron recolectadas entre el 2003 y el 2004 del Hospital General de Acapulco, y recuperadas de congelación a -80°C del cepario del Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, para ello se cultivaron en agar nutritivo y se incubaron a 35°C durante 24 a 48 hr. Por otra parte, se recolectaron 14 muestras de hemocultivos identificadas como positivas para *S. epidermidis* procedentes del Hospital Vicente Guerrero durante el año 2017. Para aislar a las bacterias, las muestras fueron cultivadas en agar sal y manitol a 35°C durante 24 hr y se seleccionó una sola colonia.

**Identificación de cepas.** Se sembraron las cepas en agar sal y manitol, donde se observaron colonias blancas de tamaño pequeño a medio. Posteriormente, se identificaron como *S. epidermidis* mediante el sistema automatizado Vitek®2 de bioMérieux. Como control se utilizó la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis*.

**Determinación de la resistencia a metilina.** Se llevó a cabo la determinación de resistencia a antibióticos mediante el sistema automatizado Vitek®2 de bioMérieux. Como control se utilizó la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis*.

**Preservación de cepas.** Se sembró mediante estría masiva una colonia de cada cepa previamente identificada en agar Müller Hinton y se incubó durante 24 hr a 35°C. Posteriormente, se cosecharon las cepas sembradas y se resuspendieron en 1.3 ml de caldo LB (Luria Bertani) más 200 µl de glicerol al 100% estéril y se almacenaron a -80°C.

**Obtención de DNA.** Se incubaron los aislamientos bacterianos durante 24 hr a 35°C en agar sal y manitol. Se eligió una sola colonia de cada aislamiento, y sembró en medio BHI (por sus siglas en inglés “Brain Heart Infusion”) a 35°C con agitación toda la noche. Posteriormente se colocó 1 ml de cada cultivo en tubos tipo Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm por 12 min. Las pastillas se lavaron con 200 µl de agua estéril y se centrifugaron a 13,000 rpm por 12 min. Después se resuspendieron en 100 µl de agua estéril, se incubaron a -20°C por 30 min, se hirvieron por 5 min y se incubaron nuevamente a -20°C por 5 min. A continuación, se centrifugaron a 13,500 rpm por 10 min, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C.

**Purificación de DNA.** A los DNA totales obtenidos previamente, se les agregó 250 µl de isopropanol frío y se mezclaron por inversión. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min, se lavaron las pastillas con 250 µl de etanol al 70% frío y se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min. Después, se dejaron secar las pastillas incubando a temperatura ambiente toda la noche, y finalmente se resuspendieron en 100 µl de agua estéril. Los DNAs obtenidos se cuantificaron utilizando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenaron a -20°C.

**Amplificación por PCR dúplex de genes confirmatorios (*nuc* y *mecA*).** Para corroborar que las cepas aisladas son *S. epidermidis* resistentes a meticilina, se realizó una PCR dúplex del gen *nuc* y *mecA* utilizando los oligonucleótidos específicos *epi* y *mecA* para cada gen respectivamente (Tabla 1). Para ello, se realizó una PCR por cada aislamiento de *S. epidermidis*. Cada reacción de PCR contenía 120 ng de DNA, 1 unidad de Taq DNA polimerasa, 1X de tampón Taq DNA polimerasa, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP, 0.24 µM de cada oligonucleótido (*epi* y *mecA*) y agua destilada estéril para obtener un volumen final de 50 µl. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo a 95°C durante 5 min; 30 ciclos de 95°C durante

1 min, 56°C durante 1 min y 72°C durante 30 s; y un ciclo a 72°C durante 10 min y enfriamiento a 4°C. Posteriormente, se corrieron 5 µl de cada reacción en un gel de agarosa al 2%. Como control positivo y negativo para ambos genes se utilizaron las cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* ATCC 29213, respectivamente.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para PCR dúplex y MLST.

Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Longitud (pb)		Referencia
		Amplicón	Alelo recortado <sup>a</sup>	
epi-F	TTGTAAACCATTCTGGACCG	251	NA	Hirotaiki <i>et al.</i> , 2011
epi-R	ATGCGTGAGATACTTCTTCG			
mecA-F	TGGCTATCGTGTCACAATCG	310	NA	Vannuffel <i>et al.</i> , 1998
mecA-R	CTGGAACCTGTTGAGCAGAG			
arcC-F	TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG	508	465	Thomas <i>et al.</i> , 2007
arcC-R	TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG			
aroE-F	CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC	459	420	
aroE-R	CAAGCGAAATCTGTTGGGG			
gtr-F	CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT	508	438	
gtr-R	GTGATTAAGGTATTGATTTGAAT			
mutS-F3	GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA	608	412	
mutS-R3	GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT			
pyr-F2	GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT	851	428	
pyr-R4	GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA			
tpi-F2	ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC	592	424	
tpi-R2	TTAATGATGCGCCACCTACA			
yqiL-F2	CACGCATAGTATTAGCTGAAG	658	416	
yqiL-R2	CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA			

NA=No aplica. <sup>a</sup> Longitud del fragmento del gen analizado para determinar la ST.

**Amplificación por PCR de genes “housekeeping”.** Se realizaron siete PCR para cada aislamiento de *S. epidermidis*, una PCR para cada uno de los siete genes “housekeeping” de MLST (Tabla 1). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l conteniendo 120 ng de DNA, 1 unidad de phusion high-fidelity DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), 1X de phusion HF buffer, 200  $\mu$ M de dNTP, y 0.24  $\mu$ M de cada oligonucleótido. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo a 95°C durante 3 min; 34 ciclos a 95°C durante 30 s, 50°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; y 1 ciclo a 72°C durante 10 min. Los fragmentos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

**Purificación de amplicones de PCR.** La purificación de los amplicones se realizó utilizando el kit de purificación de PCR PureLink® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionaron 4 volúmenes de Binding Buffer (B2) a 1 volumen de producto de PCR y se mezcló por vórtex. Después, se pasó la mezcla a una columna de centrifugación y se centrifugó a temperatura ambiente a 13,000 rpm por 1 min. Posteriormente, se lavó con 650  $\mu$ l de Wash Buffer (W1), se centrifugó a temperatura ambiente a 13,000 rpm por 1 min, se retiró el filtrado y se centrifugó nuevamente a 13,500 rpm por 3 min. A continuación, se colocó la columna en un tubo nuevo, y se eluyó el DNA con 50  $\mu$ l de agua incubando por 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 13,500 rpm por 2 min. Los amplicones de PCR purificados fueron cuantificados con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y almacenados a -20°C.

**Reacciones de Secuenciación de DNA.** Se realizaron utilizando los productos de PCR amplificados previamente y ambos oligonucleótidos (sentido y antisentido) específicos para cada gen “housekeeping”, así como el kit BigDye Terminator v.1.1 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10  $\mu$ l, conteniendo 20 ng de DNA, 0.5  $\mu$ M de oligonucleótido, 1X  $\mu$ L de BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix, 5X de Sequencing Buffer, usando las siguientes condiciones: 1 ciclo a 96°C por 1 min, 25 ciclos a 96°C por 10 s, 50°C por 5 s y 60°C por 4 min. Las reacciones se almacenaron a 4°C en oscuridad.



**Purificación de las reacciones de secuenciación de DNA.** Se purificaron las reacciones utilizando el kit BigDye® Xterminator™ Purification (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a cada reacción se añadieron 45 µl de SAM™ Solution y 10 µl de BigDye XTerminator Solution, y se mezclaron por vortex durante 30 min. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 2 min y se recuperaron los sobrenadantes (entre 20 µl y 60 µl) en Genetic Analyzer 0.5 ml Sample Tubes. Las reacciones purificadas se almacenaron a 4°C en oscuridad. Las reacciones también se purificaron por el método de precipitación por Etanol/EDTA. Brevemente, a cada reacción de secuenciación se le añadió 2.5 µl de EDTA 125 mM y 30 µl de etanol absoluto, se incubaron por 15 min y se centrifugaron a 1850 x g por 45 min. Posteriormente, se centrifugaron a 185 x g por 30 s de manera invertida, se añadieron 30 µl de etanol al 70% y centrifugaron a 1850 x g por 15 min, volviendo a centrifugar de manera invertida por 185 x g durante 1 min; finalmente las muestras se resuspendieron en 10 µl de formamida y se almacenaron a 4°C en oscuridad. Cada uno de los pasos de centrifugación se llevó a cabo a 4°C.

**Secuenciación.** La secuenciación se realizó en el secuenciador de 1 capilar ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acuerdo con la guía de uso del fabricante, ubicado en el laboratorio de Proteómica y Genómica Funcional de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Se utilizó el software 310 Data Collection con el modulo “Seq POP6 Rapid(1mL) E.md4”, empleando 15 segundos y 2.0 kV de inyección, y 15.0 kV, 50°C y 40 minutos de corrida.

**Análisis bioinformático (asignación de alelos, tipos de secuencia y relación filogenética).** Para el ensamblaje de las secuencias se utilizó el programa SeqMan Pro, que es parte del paquete de Lasergene (DNASTAR). Un alelo de referencia para cada gen “housekeeping” fue descargado de la base de datos central de MLST (<http://sepidermidis.mlst.net>) y utilizado para recortar las secuencias a los puntos de inicio y término apropiados. Se cargaron los archivos de secuencia (secuencia sentido, antisentido y de referencia) y se resolvieron las diferencias de bases entre los archivos. Los alelos se asignaron consultando la base de datos MLST. Cuando

los alelos en todos los loci fueron asignados con coincidencias del 100% a los alelos en la base de datos, se asignaron las ST consultando otra vez la base de datos. Una vez determinadas las ST, se utilizó el algoritmo eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>) para inferir la relación clonal de las ST. Como control, se utilizó la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis*, la cual está secuenciada y es ST8.

**Cuantificación de “biofilm”.** La cuantificación de “biofilm” se realizó empleando la metodología reportada por Stepanovic y colaboradores (2007). Las cepas se sembraron por estría masiva en agar Müller-Hinton y se incubaron a 35°C toda la noche. Posteriormente, las bacterias se cosecharon y se resuspendieron en 5 mL de agua destilada estéril, ajustado a una concentración de 0.5 McFarland ( $DO_{600} = 0.08$  a 0.1) con el Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para la formación del “biofilm” se sembraron 20 µl de cada inóculo ajustado en 180 µl de TSB suplementado con 1% de glucosa en placas de 96 pozos y se incubaron por 24 hr a 35°C. Posteriormente, los pozos se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS 1X, después se fijó a las bacterias con 150 µl de metanol y se dejó secar durante toda la noche. Después se tiñó con 200 µl de cristal violeta al 2% por 15 min, se retiró el colorante, se lavó dos veces con 300 µl de PBS estéril 1x. Se resuspendió el “biofilm” formado en el fondo y las paredes de los pozos con 200 µl de etanol al 95%; finalmente, la medición se realizó a 570 nm con el Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). La cuantificación de “biofilm” de cada cepa se realizó tres veces por triplicado. Para la interpretación de resultados, los valores de densidad óptica (DO) fueron promediados y se le restó la densidad óptica de corte (DOc). La DOc se definió como 3 desviaciones estándar (SD) sobre la DO promedio del control negativo. Los valores obtenidos se categorizaron en:  $DO \leq 0.3$  - no productor de “biofilm” (-),  $0.3 < DO \leq 1.0$  - débil productor de “biofilm” (+) y  $DO > 1.0$  - fuerte productor de “biofilm” (++) . Como controles se utilizaron las cepas ATCC 12228 y ATCC 35984, débil y fuerte productoras de “biofilm”, respectivamente.

## IX. RESULTADOS

### 1. Identificación de cepas

Con la finalidad de identificar si los aislamientos de *S. epidermidis* responsables de infecciones asociadas a la atención a la salud en hospitales de Acapulco provienen de la propagación de una clona predominante se analizaron 20 cepas, de las cuales 10 fueron colectadas durante los años 2003 y 2004, y las otras 10 fueron colectadas durante el año 2017. Las áreas de los hospitales donde se obtuvieron los aislados fueron diversas, como se muestra en la Tabla 2.

El perfil de resistencia de las 20 cepas se analizó mediante el sistema automatizado Vitek®2 (bioMérieux). La asignación del perfil de resistencia se realizó considerando los antibióticos: cefoxitina, bencilpenicilina, oxacilina, gentamicina, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, quinupristina/dalfopristina, vancomicina, nitrofurantona, rifampicina y trimetoprima/sulfametoxazol. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Adicionalmente se analizó la resistencia a linezolid de todas las cepas y los resultados mostraron que todas fueron sensibles.

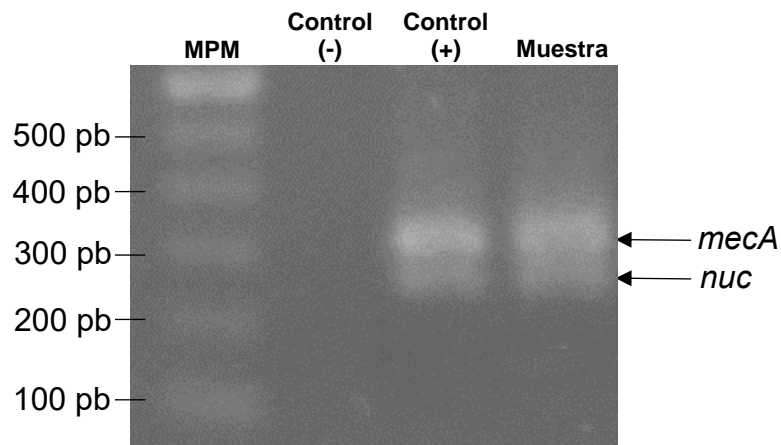
Los aislados se agruparon en 14 diferentes perfiles de resistencia, que van desde la resistencia a dos antibióticos, hasta siete de los ocho antibióticos considerados. Los perfiles de resistencia a antibióticos asignados como 1 y 4 fueron los mayormente presentes, en tres aislados cada uno (Tabla 2).

**Tabla 2.** Perfil de resistencia a antibióticos.

Perfil de resistencia	Antibióticos	Cepa <sup>a</sup>	Área	Hospital	Fecha <sup>b</sup>
1	BP, EM, CM, LE, GM, TS, RI	1069	Neonatología	General de Acapulco	23/03/04
		1091	Pediatría	General de Acapulco	11/05/04
		4204	Urgencias	Vicente Guerrero	29/09/17
2	BP, EM, CM, QDA, LE, TS, RI	1154	Neonatología	General de Acapulco	09/09/04
3	BP, EM, CM, LE, TS, RI	1047	Neonatología	General de Acapulco	03/03/04
		1103	Pediatría	General de Acapulco	11/05/04
4	BP, EM, CM, LE, GM, TS	4205	MI	Vicente Guerrero	25/09/17
		4208	MI	Vicente Guerrero	25/09/17
		4206	Urgencias	Vicente Guerrero	27/09/17
5	BP, EM, CM, GM, TS	1126	Neonatología	General de Acapulco	20/07/04
		4211	MI	Vicente Guerrero	09/10/17
6	BP, EM, CM, LE, TS	4212	UCI	Vicente Guerrero	19/10/17
7	BP, EM, GM, TS	1032	Neonatología	General de Acapulco	15/12/03
8	BP, EM, CM, TS	4202	Pediatría	Vicente Guerrero	25/09/17
9	BP, EM, CM	1042	Neonatología	General de Acapulco	03/03/04
10	BP, EM, TS	1161	Ginecología	General de Acapulco	30/09/04
11	BP, EM, GM	4214	Pediatría	Vicente Guerrero	25/10/17
12	BP, GM	585	Pediatría	General de Acapulco	08/04/03
13	BP, EM	4201	MI	Vicente Guerrero	22/08/17
14	BP, TS	4210	UCI	Vicente Guerrero	06/10/17

BP: Bencilpenicilina; EM: Eritromicina; CM: Clindamicina; QDA: Quinupristina/Dalfopristina; LE: Levofloxacino; GM: Gentamicina; TS: Trimetoprima/Sulfametoxazol; RI: Rifampicina; MI: Medicina interna; UCI: Unidad de cuidados intensivos. Ninguna cepa presentó resistencia a linezolid. <sup>a</sup> Clave de cepas identificadas en este trabajo. <sup>b</sup> Fecha de aislamiento.

La identificación de bacterias a nivel de especie mediante Vitek<sup>®</sup>2 (bioMérieux) es precisa en un 93.7% (Jin *et al.*, 2011), por lo que para corroborar que las cepas utilizadas son *S. epidermidis* con resistencia a meticilina, se diseñó una PCR dúplex para detectar los genes *nuc*, el cual es específico de *S. epidermidis* (Hirotaiki *et al.*, 2011), y *mecA*, encargado de conferir la resistencia a meticilina (Fig. 1). Todas las cepas seleccionadas fueron positivas para los dos genes, lo que confirma que nuestros aislados son *S. epidermidis* resistentes a meticilina.



**Fig. 1. PCR dúplex.** Imagen representativa de los productos correspondientes a los genes *nuc* y *mecA* en gel de agarosa al 2%. MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; Control (-): *S. aureus* ATCC 29213; Control (+): *S. epidermidis* ATCC 12228, Muestra: cepa 585.

## 2. Tipificación de secuencias multilocus

Para determinar la clona a la que pertenecen cada una de las cepas causantes de infecciones y resistentes a meticilina de *S. epidermidis* se empleó la técnica de MLST, para lo cual, se secuenciaron los fragmentos correspondientes de los genes *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA* y *yqiL* (Thomas *et al.*, 2007).

En las 20 cepas analizadas se identificaron 13 ST, de las cuales se encontró y reportó una nueva ST, debido a la nueva combinación de alelos (Tabla 3). Los datos y secuencias de los alelos de la nueva ST fueron enviadas al curador de la base de datos, quien le asignó el número de ST 761.

Las ST 2 y 23 fueron las más predominantes de este estudio, con cuatro cepas cada una; seguidas de la ST 59 con dos cepas y el resto de las ST identificados con una cepa cada una. Los países donde se han reportado previamente las ST identificadas son muy diversos y solamente las ST 2 y 23 han sido encontradas en México (Tabla 3).

**Tabla 3.** Resumen de resultados de MLST.

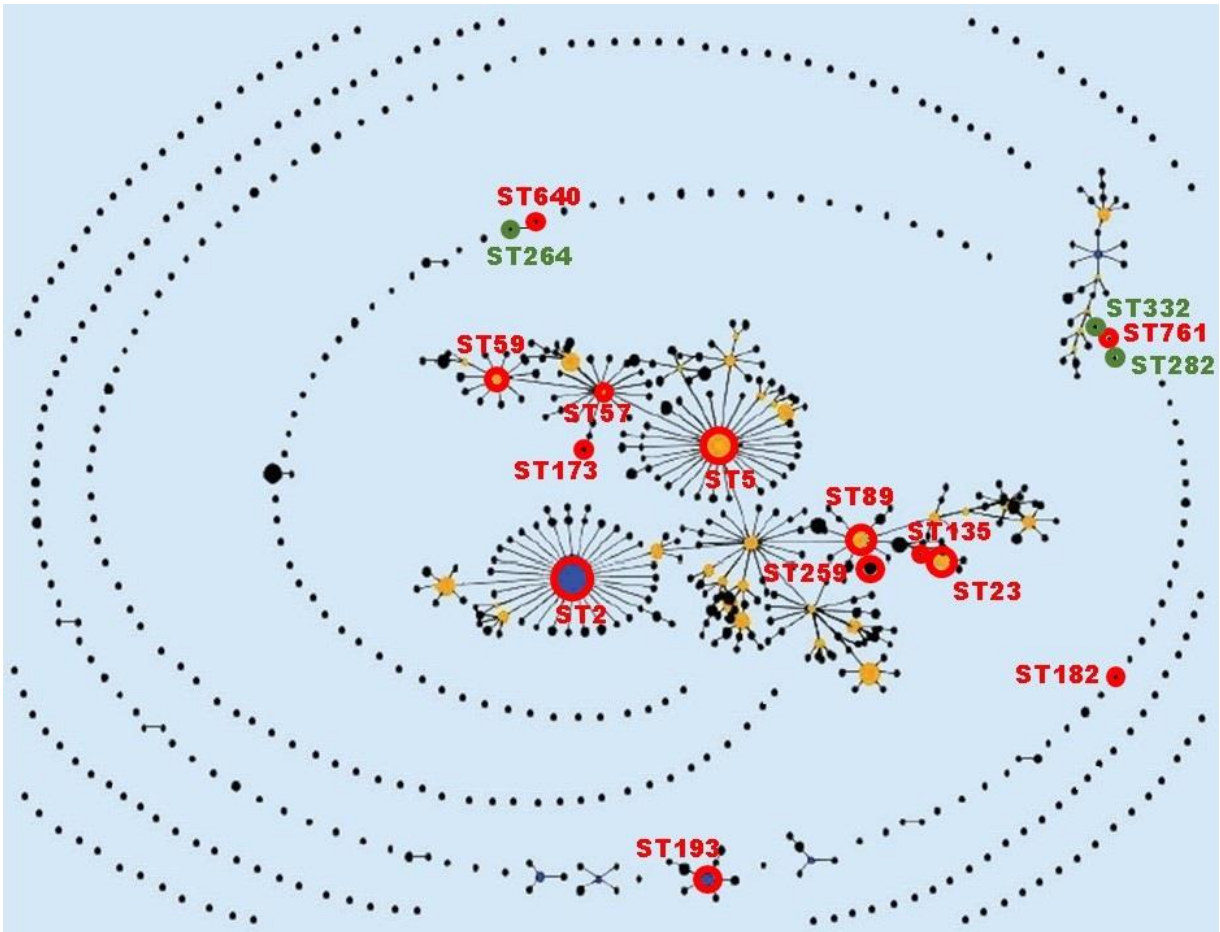
ST	Perfil de MLST ( <i>arc, aroE, gtr, mutS, pyrR, tpi, yqiL</i> )	Cepas <sup>a</sup>	Países donde se han reportado (número de aislados) <sup>b</sup>
2	7,1,2,2,4,1,1	1091, 4205, 4206, 4208	Alemania (5), Argentina (2), Brasil (18), Bulgaria (1), Cabo Verde (2), Colombia (1), Corea del Sur (19), Dinamarca (2), Francia (1), España (2), Estados Unidos (12), Grecia (2), Hungría (2), Irán (5), Irlanda (1), Islandia (2), Italia (2), Japón (3), México (2), Países bajos (1), Polonia (2), Rusia (1), Sudáfrica (4), Uruguay (2), CIE (2)
5	1,1,1,2,2,1,1	4212	Alemania (9), Bulgaria (1), Cabo Verde (1), Corea del Sur (2), Dinamarca (2), Estados Unidos (5), Islandia (1), Irán (3), Noruega (1), Polonia (2), República de Irlanda (1), CIE (2)
23	7,1,2,1,3,3,1	1047, 1069, 1103, 4204	Alemania (1), Argentina (1), Estados Unidos (1), Grecia (1), Hungría (1), Islandia (1), México (1), Polonia (1), Portugal (1), Uruguay (1)
57	1,1,1,1,2,1,1	585	Alemania (1), India (2), Portugal (1)
59	2,1,1,1,2,1,1	1042, 4202	Alemania (5), Brasil (8), Corea del Sur (4), Grecia (1), India (1), República de Irlanda (1), Rusia (21), Sudáfrica (1)
89	1,1,2,1,2,1,1	1032	China (2), Dinamarca (1), Estados Unidos (2), Islandia (1), Países bajos (1), Portugal (2)
135	7,1,2,1,3,1,1	1154	CIE (1)
173	1,6,6,1,2,1,10	1161	Alemania (1), Estados Unidos (1), Corea del Sur (1), Polonia (1)
182	12,1,5,2,3,1,20	1126	Estados Unidos (1)
193	12,1,9,8,6,5,8	4210	Camboya (6)
259	12,1,2,1,2,1,1	4214	China (6)
640	28,3,13,5,8,9,11	4201	España (1)
761 <sup>c</sup>	28,3,5,5,11,4,4	4211	NA
8	2,1,7,1,1,1,1	Control ATCC 12228	Canadá (1), Estados Unidos (1)

CIE: Colección de Colaboración Internacional sobre Endocarditis; NA: No aplica. <sup>a</sup> Clave de cepas identificadas en este trabajo. <sup>b</sup> Países y número de aislados de acuerdo con la base de datos del MLST: <http://sepidermidis.mlst.net> (hasta noviembre de 2018). <sup>c</sup> Nueva ST reportada en este trabajo.

La cepa 4201 (ST 640) guarda mayor similitud con la ST 264, teniendo el alelo 11 del gen *yqiL* en lugar del alelo 35 como la ST 264, la cual ha sido reportada solamente en la Federación Rusa (1 aislado). Por otra parte, la nueva ST 761 que pertenece a la cepa 4211, posee una ST más similar a la ST 282, reportada sólo en Alemania, y a la ST 332, reportada únicamente en Estados Unidos (Fig. 3), difiriendo en los genes *tpi* y *aroE*, respectivamente.

### **3. Relaciones clonales de *S. epidermidis***

Para establecer las relaciones de las clonas se utilizó el algoritmo eBURST V3, comparando así las ST de las cepas de este trabajo con las aisladas en otros países. Las cepas ST 2 aisladas en 2004 y 2017 y la ST 193 aislada en 2017 son consideradas fundadoras primarias a nivel internacional, sin embargo, no se encontró en este trabajo otra cepa relacionada directamente con alguna de éstas. Por otro lado, las ST 5, 23, 57, 59, 89 y 135 son fundadoras de subgrupo. Adicionalmente, la ST 23 se relaciona directamente con la ST 135, de la misma manera la ST 89 se relaciona con la ST 259 y, por otra parte, la ST 57 se relaciona con la ST 5 y 59 directamente mientras que con la ST 173 lo hace indirectamente (Fig. 2).



**Fig. 2. Diagrama eBURST.** Se muestran los grupos de ST de *S. epidermidis* vinculados y no vinculados. Círculos rojos: ST encontradas en este trabajo; círculos verdes: ST relacionadas con la ST 761 o 640; puntos azules: fundadores primarios; puntos amarillos: fundadores de subgrupos; puntos negros: otros ST. (Enero de 2019, creado de <http://sepidermidis.mlst.net>).

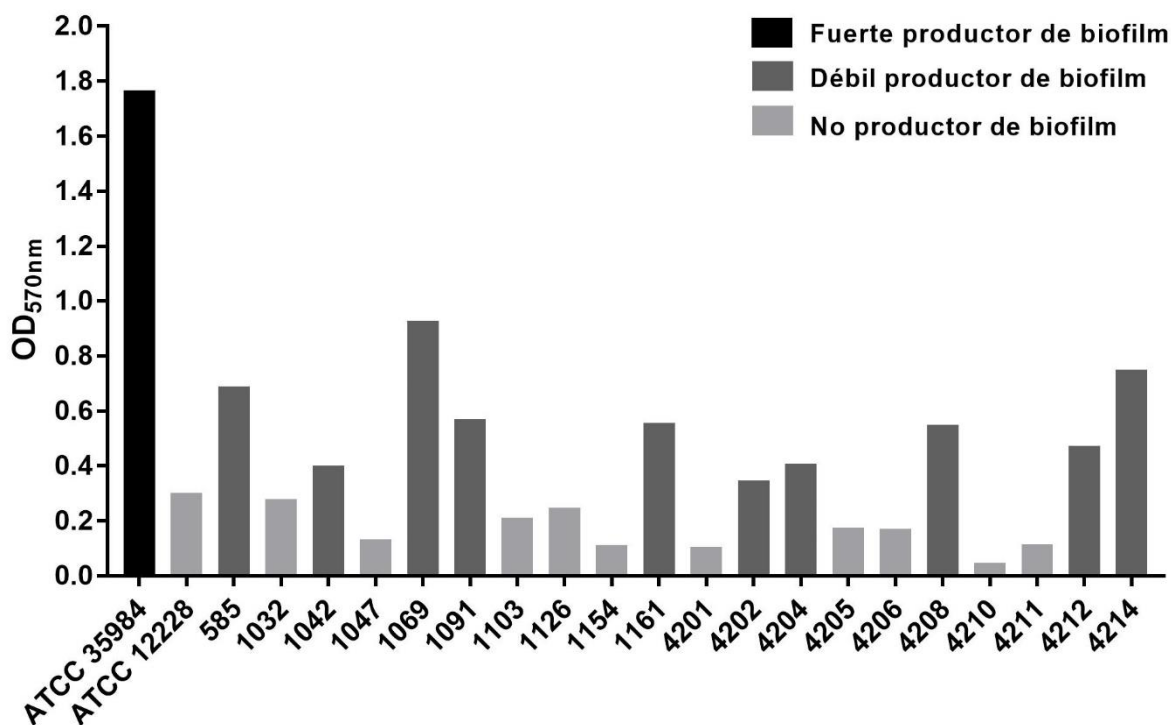
#### 4. Producción de “biofilm”

Como se mencionó anteriormente, la producción de biofilm es importante en el establecimiento de las infecciones ocasionadas por *S. epidermidis*, por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad de producir “biofilm” de los aislados obtenidos. Las cepas ATCC 35984 y 12228 se utilizaron como controles en la evaluación de producción de “biofilm”.

Ninguna de las cepas aisladas fue una fuerte productora de “biofilm”, ya que con ninguna se obtuvo una  $DO > 1$ . Diez de las cepas fueron débiles productoras y 10 fueron no productoras de “biofilm” (Fig. 3). Al hacer la relación con las ST, de las cuatro cepas pertenecientes a la ST 2 y las 4 de la ST 23 (las dos ST más frecuentes



en este estudio), dos fueron débiles productoras y dos fueron no productoras de “biofilm”. Por su parte, la cepa con la nueva ST identificada fue no productora de biofilm. A pesar de que todas las cepas analizadas en este estudio fueron aisladas de infecciones nosocomiales, ninguna resultó ser fuerte productor de biofilm. Esto sugiere que, en el caso de estas cepas, la producción de “biofilm” podría no ser esencial durante toda la infección.



**Fig. 3. Producción de biofilm.** Control: ATCC 35984, fuerte productor de biofilm; ATCC 12228, no productor de biofilm.

## X. DISCUSIÓN

*S. epidermidis* es capaz de colonizar dispositivos médicos implantados, pudiendo progresar a una infección; por ejemplo, la bacteriemia es causada predominantemente por el ingreso de la bacteria a la sangre a través de dispositivos médicos intravasculares colonizados, recomendando en estos casos la extracción del dispositivo como parte integral del tratamiento del paciente (Hogan *et al.*, 2015).

Los aislamientos utilizados en este trabajo provienen de muestras de sangre que, en condiciones normales, es un fluido estéril; sin embargo, la presencia en sangre de *S. epidermidis* es porque posee los factores de virulencia necesarios para tal cometido y/o accedió por una vía de entrada idónea. La mayoría de los aislados fue de niños en áreas de pediatría o neonatos, lo cual puede ser debido a que el acceso de bacterias a fluidos corporales es más común en niños, principalmente los neonatos prematuros, ya que poseen un sistema inmune inmaduro y sus barreras mucosas son más permeables (Bjorkqvist *et al.*, 2010).

Las cepas aisladas fueron previamente identificadas por el Vitek®2 (bioMérieux), y su perfil de resistencia analizado también por este método. Sin embargo, se ha visto que la identificación de bacterias con este equipo puede variar dependiendo de lo rápido o lento que sea su metabolismo, disminuyendo así su precisión debido al tiempo de incubación requerido (Jin *et al.*, 2011), por lo que para corroborar la identificación y la resistencia diseñamos una PCR dúplex. Este es el primer trabajo donde se aplica esta PCR dúplex, con base en oligonucleótidos previamente reportados (Tabla 1), por lo que esta técnica rápida de identificación podría ser de mucha utilidad en trabajos futuros.

En este trabajo se analizaron aislamientos de *S. epidermidis* causantes de infecciones en hospitales de la ciudad de Acapulco de diferentes décadas (13 años de diferencia), todos los aislados fueron resistentes a meticilina, provenientes de hemocultivos de pacientes de la misma región. Se identificaron 13 STs, de las cuales una es nueva. Nuestros resultados muestran que existe una propagación clonal de

las STs 2 y 23, debido a que ambas se aislaron en el año 2004 y posteriormente en 2017 en hospitales de Acapulco, es decir en la misma región geográfica, pero en distintas áreas y fechas.

La evidente propagación y resistencia a diversos antibióticos de las STs 2 y 23 resaltan la importancia de la vigilancia epidemiológica de dichas cepas; adicionalmente, debido a la resistencia a diversos antibióticos, también habría que mantener en vigilancia epidemiológica a la ST 135. A mayor número de antibióticos a los cuales puede presentar resistencia una bacteria, son menos las opciones de tratamiento y por ende aumenta el tiempo de hospitalización y las probabilidades de complicaciones, junto a lo que todo eso representa, como mayor gasto económico.

Interesantemente, las clonas ST 2 y 23 se han reportado previamente en México, aisladas de pacientes con bacteriemia (Martínez-Meléndez *et al.*, 2016; Miragaia *et al.*, 2007), infección ocular o incluso piel y conjuntiva sana (Flores-Páez *et al.*, 2015; Juárez-Verdayes *et al.*, 2013). Adicionalmente en México, la ST 57 se ha aislado de infección ocular, mientras que las STs 135 y 173 se han encontrado en conjuntiva sana (Flores-Páez *et al.*, 2015; Juárez-Verdayes *et al.*, 2013). En México solamente se habían reportado las STs 2, 5, 23, 57, 135, 173; por lo que las STs 59, 89, 182, 193, 259 y 761 encontradas en este trabajo enriquecen la información existente para futuros estudios epidemiológicos referentes a *S. epidermidis* en el país (Flores-Páez *et al.*, 2015; Juárez-Verdayes *et al.*, 2013; Martínez-Meléndez *et al.*, 2016).

También hay que considerar que las STs 135 y 173 en México sólo se habían encontrado en conjuntiva sana, es decir, sin causar alguna patología. En este trabajo encontramos cepas pertenecientes a estas STs aisladas de bacteremia, de las cuales resalta la ST 135, que es resistente a siete de los antibióticos probados y por lo cual se recomendaría tener en vigilancia epidemiológica.

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas 1047 y 1103 son ST 23 con el mismo perfil de resistencia a antibióticos, pero fueron aisladas en diferentes áreas hospitalarias dentro del mismo hospital, aunque en el mismo año, sugiriendo la diseminación de la bacteria de un área a otra. Considerando las fechas de los

aislamientos, la diseminación fue del área de neonatología a la de pediatría, posiblemente por causa del personal de atención de la salud. Así mismo, las cepas 4205, 4206 y 4208, que son ST 2 y tienen idéntico perfil de resistencia a antibióticos, fueron aisladas en medicina interna y urgencias del hospital Vicente Guerrero en el año 2017, sugiriendo la diseminación de la clona.

Por otra parte, las cepas 1126 y 4211 poseen el mismo perfil de resistencia; sin embargo, fueron aisladas en áreas, hospitales y años distintos, además de ser ST diferentes. Lo anterior indica que estas dos bacterias adquirieron un perfil de resistencia a antimicrobianos similar de manera independiente.

Las cepas 1069, 1091 y 4204 tienen idéntico perfil de resistencia; la 4204 (ST 23) se aisló en año y hospital distinto a las otras dos, mientras que las cepas 1069 (ST 23) y 1091 (ST 2) difieren entre ellas en la ST y área hospitalaria donde fueron aisladas. Lo anterior pudiera sugerir la transmisión de genes de resistencia entre las cepas 1069 y 1091, que pudieron ser preservados en la cepa 4204, al pertenecer a la misma clona que la 1069. Esto no es de forma concluyente, pero un análisis de SCCmec y los genes transferibles de resistencia a antibióticos podría dar mayores indicios sobre la relación de estas cepas.

Las STs 2 y 23 fueron las más abundantes, teniendo 4 cepas cada una, lo que coincide con lo reportado previamente en México e internacionalmente (Tabla 3) (Flores-Páez *et al.*, 2015; Juárez-Verdayes *et al.*, 2013; Martínez-Meléndez *et al.*, 2016; Miragaia *et al.*, 2007). La vigilancia epidemiológica de estas clonas es importante, debido a que se han reportado estas mismas clonas con resistencia a linezolid tanto en México (Martínez-Meléndez *et al.*, 2016), como en otros países (Saffari *et al.*, 2016; Wessels *et al.*, 2018). El linezolid supone una buena opción terapéutica contra *S. epidermidis* resistente a meticilina, sin embargo, la resistencia contra este fármaco limita las opciones de tratamiento.

Asimismo, los mecanismos más importantes para la virulencia de *S. epidermidis* son la adherencia a dispositivos médicos permanentes y la formación de “biofilm”, lo que facilita la evasión de la defensa del hospedero y el tratamiento antimicrobiano

(Kleinschmidt *et al.*, 2015). En el presente trabajo se observa que las cepas 1069 (ST 232), 1091 (ST 2) y 4204 (ST 23) son las que presentan resistencia a una mayor cantidad de antibióticos y siendo todas ellas débiles productoras de “biofilm”; sin embargo, no se observa esta relación en el resto de las cepas, lo cual sugeriría que la producción de “biofilm” de las cepas causantes de estas infecciones no juega un papel importante en la resistencia a antibióticos, lo cual resulta ser contradictorio, ya que se ha sugerido una asociación entre la producción de “biofilm” con la disminución de la susceptibilidad a vancomicina y la resistencia a meticilina (Pinheiro *et al.*, 2014). Por lo cual, en futuros trabajos podría determinarse la presencia y expresión de los genes responsables de la producción de “biofilm”, tales como *icaA*, *aap*, *bhp* y *ygs* (Freitas *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2011).

Interesantemente, se encontró una nueva ST correspondiente a la cepa 4211, obtenida a partir de una nueva combinación de alelos. La ST 761 es similar a la ST 282 y 332. La ST 332 pertenece al complejo clonal 365 y se relaciona directamente con la nueva ST de la cepa 4211, que a su vez se relaciona directamente con la ST 282, la cual es un singleton (Fig. 2). Por consiguiente, el descubrimiento de nuevas ST es un indicador de que la población de *S. epidermidis* continúa evolucionando, ya sea por mutaciones o recombinación genética.

La ST 761 fue aislada de un paciente del área de Medicina Interna del Hospital Vicente Guerrero durante el año 2017, y presenta resistencia a bencilpenicilina, eritromicina, clindamicina, gentamicina y trimetoprima/sulfametoxazol. Por lo cual, sería interesante investigar si se encuentra en cepas aisladas de otras infecciones distintas de la bacteremia, así como si se ha diseminado a otras regiones geográficas.

## XI. CONCLUSIONES

En conclusión, los aislados de *S. epidermidis* resistentes a meticilina responsables de IAAS en hospitales de la ciudad de Acapulco pertenecen a 14 diferentes STs; de las cuales algunas se relacionan, y resultando ser las STs 2 y 23 predominantes en diferentes décadas, lo cual evidencia su diseminación. Además, la producción abundante de biofilm pareciera no ser imprescindible durante todo el proceso infeccioso de estas cepas, debido a que en este trabajo sólo se observaron cepas no productoras y débiles productoras de “biofilm”. Lo anterior resalta la importancia de que el personal de hospitalario aplique las medidas de prevención necesarias para el control de estas infecciones, incluyendo el responsable uso de antibióticos y la constante vigilancia epidemiológica.

Finalmente, el presente trabajo resulta relevante debido a que reportamos una nueva PCR dúplex capaz de identificar a las cepas de *S. epidermidis* resistentes a meticilina, e identificamos por primera vez las STs de *S. epidermidis* presentes en hospitales de Acapulco, de las cuales las ST 5, 59, 89, 182, 193, 259 y 640 son reportadas por primera vez en México y la ST 761 por primera vez en todo el mundo.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Informe clínico de Vitek®2 (bioMérieux)

IMSS H.G.R. #1 "VICENTE GUERRERO"  
Informe clínico

Nº de Cliente: 4520 Editado 02-oct-2017 11:55 CST

Nombre del paciente: Nº paciente: 170928035250  
Localización: 04  
Nº de examen: 170928035250 Nº de aislamiento: 2

Cantidad de organismo:  
Organismo seleccionado: Staphylococcus epidermidis

Origen: H Recogida: 01-oct-2017 1638

<b>Comentarios:</b>	
---------------------	--

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 5,00 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	99% Probabilidad	<b>Staphylococcus epidermidis</b>
<b>Mensajes de análisis de ID</b>	<b>Bionúmero:</b>	010000074620211

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis:	Estado:			
	10,50 horas	Final			
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina	POS	+	Eritromicina	>= 8	R
Bencilpenicilina	>= 0,5	R	Clindamicina	>= 8	R
Ampicilina			Quinupristina/Dalfopristina	<= 0,25	S
Oxacilina	>= 4	R	Linezolid	1	S
Gentamicina de nivel alto (sinergia)			Vancomicina	2	S
Estreptomina de nivel alto (sinergia)			Tetraciclina	<= 1	S
Gentamicina	<= 0,5	S	Tigeciclina	<= 0,12	S
Ciprofloxacino	>= 8	R	Nitrofurantoína	<= 16	S
Levofloxacino	>= 8	R	Rifampicina	<= 0,5	S
Moxifloxacino	2	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 10	S
Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-			

+= Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

Conclusiones de AES		
<b>Nivel de confianza:</b>	Coherente	
<b>Fenotipos marcados para revisión:</b>	GLICOPÉPTIDOS	RESISTENTE (TEC)
	BETA-LACTÁMICOS	MODIFICACIÓN DE PBP (mecA)

## Anexo 2. Resumen de resultados

Perfil de resistencia	Antibióticos	Cepa <sup>a</sup>	ST	Biofilm	Área	Hospital	Fecha <sup>b</sup>
1	BP, EM, CM, LE, GM, TS, RI	1069	23	+	Neonatología	GA	23/03/04
		1091	2	+	Pediatría	GA	11/05/04
		4204	23	+	Urgencias	VG	29/09/17
2	BP, EM, CM, QDA, LE, TS, RI	1154	135	-	Neonatología	GA	09/09/04
3	BP, EM, CM, LE, TS, RI	1047	23	-	Neonatología	GA	03/03/04
		1103	23	-	Pediatría	GA	11/05/04
4	BP, EM, CM, LE, GM, TS	4205	2	-	MI	VG	25/09/17
		4208	2	+	MI	VG	25/09/17
		4206	2	-	Urgencias	VG	27/09/17
5	BP, EM, CM, GM, TS	1126	182	-	Neonatología	GA	20/07/04
		4211	761	-	MI	VG	09/10/17
6	BP, EM, CM, LE, TS	4212	5	+	UCI	VG	19/10/17
7	BP, EM, GM, TS	1032	89	-	Neonatología	GA	15/12/03
8	BP, EM, CM, TS	4202	59	+	Pediatría	VG	25/09/17
9	BP, EM, CM	1042	59	+	Neonatología	GA	03/03/04
10	BP, EM, TS	1161	173	+	Ginecología	GA	30/09/04
11	BP, EM, GM	4214	259	+	Pediatría	VG	25/10/17
12	BP, GM	585	57	+	Pediatría	GA	08/04/03
13	BP, EM	4201	640	-	MI	VG	22/08/17
14	BP, TS	4210	193	-	UCI	VG	06/10/17

BP: Bencilpenicilina; EM: Eritromicina; CM: Clindamicina; QDA: Quinupristina/Dalfopristina; LE: Levofloxacino; GM: Gentamicina; TS: Trimetoprima/Sulfametoxazol; RI: Rifampicina; MI: Medicina interna; UCI: Unidad de cuidados intensivos. Ni una cepa presentó resistencia a linezolid; GA: Hospital General de Acapulco; VG Hospital Vicente Guerrero. <sup>a</sup> Clave de cepas identificadas en este trabajo. <sup>b</sup> Fecha de aislamiento. + Cepa débil productora de biofilm; - Cepa no productora de biofilm.



### XIII. REFERENCIAS

- ALAHMADI, Y. M., ALDEYAB, M. A., MCELNAY, J. C., SCOTT, M. G., DARWISH ELHAJJI, F. W., MAGEE, F. A., DOWDS, M., EDWARDS, C., FULLERTON, L., TATE, A. & KEARNEY, M. P. 2011. Clinical and economic impact of contaminated blood cultures within the hospital setting. *J Hosp Infect*, 77(3): 233-236.
- BAIG, S., JOHANNESSEN, T. B., OVERBALLE-PETERSEN, S., LARSEN, J., LARSEN, A. R. & STEGGER, M. 2018. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 61: 74-76.
- BAYM, M., STONE, L. K. & KISHONY, R. 2016. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*. 351(6268): aad3292.
- BECKER, K., HEILMANN, C. & PETERS, G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 27(4): 870-926.
- BJORKQVIST, M., LILJEDAHL, M., ZIMMERMANN, J., SCHOLLIN, J. & SODERQUIST, B. 2010. Colonization pattern of coagulase-negative staphylococci in preterm neonates and the relation to bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(9): 1085-1093.
- CABRERA-CONTRERAS, R., MORELOS-RAMIREZ, R., GALICIA-CAMACHO, A. N. & MELÉNDEZ-HERRADA, E. 2013. Antibiotic resistance and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from a tertiary care hospital in Mexico City. *ISRN Microbiol*, 2013: 918921.
- CHAUDHRY, V. & PATIL, P. B. 2016. Genomic investigation reveals evolution and lifestyle adaptation of endophytic *Staphylococcus epidermidis*. *Sci Rep.* 6: 19263.
- CHEN, H. W., LIU, P. F., LIU, Y. T., KUO, S., ZHANG, X. Q., SCHOOLEY, R. T., ROHDE, H., GALLO, R. L. & HUANG, C. M. 2016. Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* counteracts influenza virus. *Sci Rep*, 6: 27870.
- CHENG, Y., AVULA, S. R., GAO, W. W., ADDLA, D., TANGADANCHU, V. K., ZHANG, L., LIN, J. M. & ZHOU, C. H. 2016. Multi-targeting exploration of new 2-aminothiazolyl quinolones: Synthesis, antimicrobial evaluation, interaction with DNA, combination with topoisomerase IV and penetrability into cells. *Eur J Med Chem.* 124: 935-945.
- CHESSA, D., GANAU, G. & MAZZARELLO, V. 2015. An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 9(6): 547-550.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 27 ed.
- DAVENPORT, K. W., DALIGAULT, H. E., MINOGUE, T. D., BISHOP-LILLY, K. A., BROOMALL, S. M., BRUCE, D. C., CHAIN, P. S., COYNE, S. R., FREY, K. G., GIBBONS, H. S., JAISSE, J., REDDEN, C. L., ROSENZWEIG, C. N., SCHOLZ, M. B., TESHIMA, H. & JOHNSON, S. L. 2014. Complete genome assembly of *Staphylococcus epidermidis* AmMS 205. *Genome Announc.* 2(6). pii: e01059-14.
- DEPLANO, A., VANDENDRIESSCHE, S., NONHOFF, C., DODEMONT, M., ROISIN, S. & DENIS, O. 2016. National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from

- bloodstream infections in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 71(7): 1815-1819.
- DONG, Y. & SPEER, C. P. 2014. The role of *Staphylococcus epidermidis* in neonatal sepsis: guarding angel or pathogenic devil? *Int J Med Microbiol.* 304(5-6): 513-520.
- DOUDOULAKAKIS, A., SPILIOPOULOU, I., SPYRIDIS, N., GIORMEZIS, N., KOPSIDAS, J., MILITSOPOULOU, M., LEBESSI, E. & TSOLIA, M. 2017. Emergence of a *Staphylococcus aureus* clone resistant to mupirocin and fusidic acid carrying exotoxin genes and causing mainly skin infections. *J Clin Microbiol.* 55(8): 2529-2537.
- DU, X., ZHU, Y., SONG, Y., LI, T., LUO, T., SUN, G., YANG, C., CAO, C., LU, Y. & LI, M. 2013. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS One.* 8(5): e62742.
- FARID, A., NAZ, I., ASHRAF, A., ALI, A., REHMAN, A. U., SARWAR, Y. & HAQUE, A. 2015. Molecular detection of antimicrobial resistance in local isolates of *Staphylococcus epidermidis* from urinary tract infections in Faisalabad region of Pakistan. *EXCLI J.* 14: 697-705.
- FERNANDO, S. A., GRAY, T. J. & GOTTLIEB, T. 2017. Healthcare-acquired infections: prevention strategies. *Intern Med J.* 47(12): 1341-1351.
- FLORES-PÁEZ, L. A., ZENTENO, J. C., ALCÁNTAR-CURIEL, M. D., VARGAS-MENDOZA, C. F., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, S., CANCINO-DÍAZ, M. E., JAN-ROBLERO, J. & CANCINO-DÍAZ, J. C. 2015. Molecular and phenotypic characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates from healthy conjunctiva and a comparative analysis with isolates from ocular infection. *PLoS One.* 10(8): e0135964.
- FREITAS, A. I., LOPES, N., OLIVEIRA, F., BRAS, S., FRANCA, A., VASCONCELOS, C., VILANOVA, M. & CERCA, N. 2018. Comparative analysis between biofilm formation and gene expression in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Future Microbiol.* 13: 415-427.
- GOERING, R. V. & FEY, P. D. 2014. Pulsed field gel electrophoresis of *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol.* 1106: 55-60.
- GOMES, F., TEIXEIRA, P. & OLIVEIRA, R. 2013. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling.* 30(2): 131-141.
- GOSTEV, V., KRUGLOV, A., KALINOGORSKAYA, O., DMITRENKO, O., KHOKHLOVA, O., YAMAMOTO, T., LOBZIN, Y., RYABCHENKO, I. & SIDORENKO, S. 2017. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Infect Genet Evol.* 53: 189-194.
- HAVAEI, S. A., NAMVAR, A. E., MOGHIM, S. & LARI, A. R. 2015. Evaluation of various staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types in *Staphylococcus epidermidis* invasive strains from hospitalized patients in Iran. *Infez Med.* 23(1): 18-22.
- HIROTAKI, S., SASAKI, T., KUWAHARA-ARAI, K., & HIRAMATSU, K. 2011. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 49(10): 3627-3631.
- HOGAN, S., STEVENS, N. T., HUMPHREYS, H., O'GARA, J. P. & O'NEILL, E. 2015. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Curr Pharm Des.* 21(1): 100-113.

- HON, K. L., TSANG, Y. C., PONG, N. H., LEUNG, T. F. & IP, M. 2016. Exploring *Staphylococcus epidermidis* in atopic eczema: friend or foe? *Clin Exp Dermatol.* 41(6): 659-663.
- HOTTERBEEKX, A., XAVIER, B. B., BIELEN, K., LAMMENS, C., MOONS, P., SCHEPENS, T., IEVEN, M., JORENS, P. G., GOOSSENS, H., KUMAR-SINGH, S. & MALHOTRA-KUMAR, S. 2016. The endotracheal tube microbiome associated with *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus epidermidis*. *Sci Rep.* 6: 36507.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC.). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12): 4961-4967.
- JIN, W. Y., JANG, S. J., LEE, M. J., PARK, G., KIM, M. J., KOOK, J. K., KIM, D. M., MOON, D. S. & PARK, Y. J. 2011. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 70(4): 442-447.
- JUÁREZ-VERDAYES, M. A., RAMÓN-PERÉZ, M. L., FLORES-PÁEZ, L. A., CAMARILLO-MÁRQUEZ, O., ZENTENO, J. C., JAN-ROBLERO, J., CANCINO-DIAZ, M. E. & CANCINO-DIAZ, J. C. 2013. *Staphylococcus epidermidis* with the icaA/icaD/IS256 genotype and protein or protein/extracellular-DNA biofilm is frequent in ocular infections. *J Med Microbiol.* 62(Pt 10): 1579-1587.
- JUDA, M., CHUDZIK-RZAD, B. & MALM, A. 2016. The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 111(3): 155-160.
- KARLOWSKY, J. A., NICHOL, K. & ZHANEL, G. G. 2015. Telavancin: mechanisms of action, in vitro activity, and mechanisms of resistance. *Clin Infect Dis.* 61 Suppl 2: 58-68.
- KHAN, H. A., AHMAD, A. & MEHBOOB, R. 2015. Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5(7): 509-514.
- KHAN, S. N. & KHAN, A. U. 2016. Breaking the spell: Combating multidrug resistant 'superbugs'. *Front Microbiol.* 7: 174.
- KLEINSCHMIDT, S., HUYGENS, F., FAOAGALI, J., RATHNAYAKE, I. U. & HAFNER, L. M. 2015. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiol.* 10(11): 1859-1879.
- KOCIANOVA, S., VUONG, C., YAO, Y., VOYICH, J. M., FISCHER, E. R., DELEO, F. R. & OTTO, M. 2005. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest.* 115(3): 688-694.
- LAYER, F., VOURLI, S., KARAVASILIS, V., STROMMENGER, B., DAFOPOULOU, K., TSAKRIS, A., WERNER, G. & POURNARAS, S. 2018. Dissemination of linezolid-dependent, linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates belonging to CC5 in German hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 73: 1181-1184.
- LIU, C., JI, J., LI, S., WANG, Z., TANG, L., CAO, W. & SUN, X. 2016. Microbiological isolates and antibiotic susceptibilities: A 10-year review of culture-proven endophthalmitis cases. *Curr Eye Res.* 42(3): 443-447.

- MARRS, T. & FLOHR, C. 2016. The role of skin and gut microbiota in the development of atopic eczema. *Br J Dermatol.* 175 Suppl 2: 13-18.
- MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A., MORFÍN-OTERO, R., VILLARREAL-TREVIÑO, L., CAMACHO-ORTÍZ, A., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G., LLACA-DÍAZ, J., RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. & GARZA-GONZÁLEZ, E. 2016. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. *Braz J Infect Dis.* 20(5): 419-428.
- MERIC, G., MIRAGAIA, M., DE BEEN, M., YAHARA, K., PASCOE, B., MAGEIROS, L., MIKHAIL, J., HARRIS, L. G., WILKINSON, T. S., ROLO, J., LAMBLE, S., BRAY, J. E., JOLLEY, K. A., HANAGE, W. P., BOWDEN, R., MAIDEN, M. C., MACK, D., DE LENCASTRE, H., FEIL, E. J., CORANDER, J. & SHEPPARD, S. K. 2015. Ecological overlap and horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biol Evol.* 7(5): 1313-1328.
- MIRAGAIA, M., THOMAS, J. C., COUTO, I., ENRIGHT, M. C. & DE LENCASTRE, H. 2007. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 189(6): 2540-2552.
- MIRAGAIA, M., CARRICO, J. A., THOMAS, J. C., COUTO, I., ENRIGHT, M. C. & DE LENCASTRE, H. 2008. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J Clin Microbiol.* 46(1): 118-129.
- MIRZAEI, B., MOOSAVI, S. F., BABAEI, R., SIADAT, S. D., VAZIRI, F. & SHAHROOEI, M. 2016. Purification and evaluation of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol.* 73(5): 611-617.
- MISIC, A. M., CAIN, C. L., MORRIS, D. O., RANKIN, S. C. & BEITING, D. P. 2016. Divergent isoprenoid biosynthesis pathways in *Staphylococcus* species constitute a drug target for treating infections in companion animals. *mSphere.* 1(5). pii: e00258-16.
- MORGENSTERN, M., POST, V., ERICHSEN, C., HUNGERER, S., BUHREN, V., MILITZ, M., RICHARDS, R. G. & MORIARTY, T. F. 2016. Biofilm formation increases treatment failure in *Staphylococcus epidermidis* device-related osteomyelitis of the lower extremity in human patients. *J Orthop Res.* 34(11): 1905-1913.
- NAJAR-PEERAYEH, S., MOGHADDAS, A. J., BAKHSHI, B. & GHASEMIAN, A. 2016. Diversity of the SCCmec types among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from intensive care unit patients. *Asian Pac J Trop Dis.* 6(2): 133-135.
- NAMVAR, A. E., BASTARAHANG, S., ABBASI, N., GHEHI, G. S., FARHADBAKHTIARIAN, S., AREZI, P., HOSSEINI, M., BARAVATI, S. Z., JOKAR, Z. & CHERMAHIN, S. G. 2014. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control.* 9(23): Doc23.
- ONG, P. Y. & LEUNG, D. Y. 2016. Bacterial and viral infections in atopic dermatitis: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 51(3): 329-337.
- ONISHI, M., URUSHIBARA, N., KAWAGUCHIYA, M., GHOSH, S., SHINAGAWA, M., WATANABE, N. & KOBAYASHI, N. 2013. Prevalence and genetic diversity of arginine catabolic mobile element (ACME) in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci: identification of ACME type I variants in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Genet Evol.* 20: 381-388.

- PAHARIK, A. E. & HORSWILL, A. R. 2016. The Staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr.* 4(2).
- PINHEIRO, L., BRITO, C. I., PEREIRA, V. C., DE OLIVEIRA, A., CAMARGO, C. H. & DA CUNHA, M. D. L. R. D. S. 2014. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109(7): 871-878.
- RAMIREZ, M. S., & TOLMASKY, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 13(6): 151–171.
- RAY, M. D., BOUNDY, S. & ARCHER, G. L. 2016. Transfer of the methicillin resistance genomic island among staphylococci by conjugation. *Mol Microbiol.* 100(4): 675-685.
- RHOVE. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. 2016. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica hospitalaria.
- SAFFARI, F., WIDERSTROM, M., GURRAM, B. K., EDEBRO, H., HOJABRI, Z. & MONSEN, T. 2016. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant clones of *Staphylococcus epidermidis* in Iranian hospitals: Clonal relatedness to healthcare-associated methicillin-resistant isolates in Northern Europe. *Microb Drug Resist.* 22(7): 570-577.
- SAHAL, G. & BILKAY, I. S. 2014. Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Braz J Microbiol.* 45(2): 539-544.
- SCHOENFELDER, S. M., LANGE, C., ECKART, M., HENNIG, S., KOZYTSKA, S. & ZIEBUHR, W. 2010. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol.* 300(6): 380-386.
- SHARMA, P., SATORIUS, A. E., RAFF, M. R., RIVERA, A., NEWTON, D. W. & YOUNGER, J. G. 2014. Multilocus sequence typing for interpreting blood isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014: 787458.
- SINGH, R., RAY, P., DAS, A. & SHARMA, M. 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 65(9): 1955-1958.
- SPILIOPOULOU, A. I., KREVVATA, M. I., KOLONITSIOU, F., HARRIS, L. G., WILKINSON, T. S., DAVIES, A. P., DIMITRACOPOULOS, G. O., KARAMANOS, N. K., MACK, D. & ANASTASSIOU, E. D. 2012. An extracellular *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide: relation to Polysaccharide Intercellular Adhesin and its implication in phagocytosis. *BMC Microbiol.* 12: 76.
- STACY, A., MCNALLY, L., DARCH, S. E., BROWN, S. P. & WHITELEY, M. 2016. The biogeography of polymicrobial infection. *Nat Rev Microbiol.* 14(2): 93-105.
- STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., HOLA, V., DI BONAVENTURA, G., DJUKIC, S., CIRKOVIC, I. & RUZICKA, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115(8): 891-899.
- STOJANOV, M., SAKWINSKA, O. & MOREILLON, P. 2013. Expression of SCCmec cassette chromosome recombinases in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 68(4): 749-757.
- SULLIVAN, C. B., DIGGLE, M. A. & CLARKE, S. C. 2005. Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and public health. *Mol Biotechnol.* 29(3): 245-254.

- THOMAS, J. C., VARGAS, M. R., MIRAGAIA, M., PEACOCK, S. J., ARCHER, G. L. & ENRIGHT, M. C. 2007. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 45(2): 616-619.
- THOMAS, J. C. & ROBINSON, D. A. 2014. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol.* 1106: 61-69.
- VANNUFFEL, P., LATERRE, P.-F., BOUYER, M., GIGI, J., VANDERCAM, B., REYNAERT, M., & GALA, J.-L. 1998. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *J Clin Microbiol.* 36(8): 2366–2368.
- WANG, X., NIU, C., SUN, G., DONG, D., VILLARUZ, A. E., LI, M., WANG, D., WANG, J., OTTO, M. & GAO, Q. 2011. *ygs* is a novel gene that influences biofilm formation and the general stress response of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 79(3): 1007-1015.
- WEIS, S., KAASCH, A. J., RIEG, S., LOFFLER, B., HAGEL, S., FORSTNER, C., BRUNKHORST, F. M. & PLETZ, M. W. 2015. *Staphylococcus aureus* bacteremia - a distinct entity. *Dtsch Med Wochenschr.* 140(13): 982-989.
- WESSELS, C., STROMMINGER, B., KLARE, I., BENDER, J., MESSLER, S., MATTNER, F., KRAKAU, M., WERNER, G. & LAYER, F. 2018. Emergence and control of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an ICU of a German hospital. *J Antimicrob Chemother.* 73(5): 1185-1193.
- WIDERSTROM, M., WISTRÖM, J., SJOSTEDT, A. & MONSEN, T. 2012. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31(1): 7-20.
- WIDERSTROM, M., WISTRÖM, J., EDEBRO, H., MARKLUND, E., BACKMAN, M., LINDQVIST, P. & MONSEN, T. 2016. Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis.* 16(1): 743.
- WISPLINGHOFF, H., ROSATO, A. E., ENRIGHT, M. C., NOTO, M., CRAIG, W. & ARCHER, G. L. 2003. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(11): 3574-3579.
- YIM, G., WANG, W., THAKER, M. N., TAN, S. & WRIGHT, G. D. 2016. How to make a glycopeptide: A synthetic biology approach to expand antibiotic chemical diversity. *ACS Infect Dis.* 2(9): 642-650.
- ZAATREH, S., WEGNER, K., STRAUSS, M., PASOLD, J., MITTELMEIER, W., PODBIELSKI, A., KREIKEMEYER, B. & BADER, R. 2016. Co-culture of *S. epidermidis* and human osteoblasts on implant surfaces: An advanced in vitro model for implant-associated infections. *PLoS One.* 11(3): e0151534.