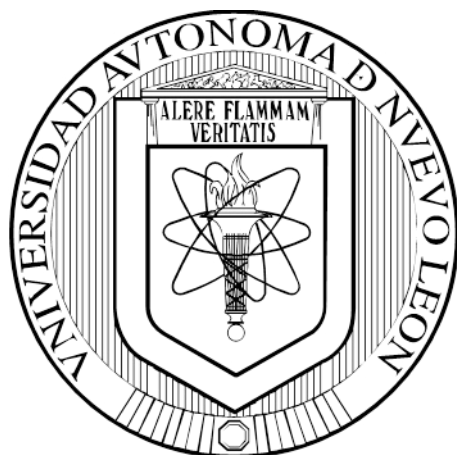


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri*

POR

SORAYA SARAHÍ MENDOZA OLAZARÁN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

ENERO, 2016

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y
Staphylococcus sciuri

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente

Dra. Norma L. Heredia Rojas
Secretario

Dra. Elvira Garza González
Vocal

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y
*Staphylococcus sciuri***

Dirección de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño

Director

Dra. Elvira Garza González

Director externo

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y
*Staphylococcus sciuri***

por

M. C. Soraya Sarahí Mendoza Olazarán

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño, en el Laboratorio Central y Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del Hospital Universitario “Dr. José E. González” bajo la asesoría de la Dra. Elvira Garza González.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Facultad de Ciencias Biológicas** y a todo el personal que permitió la realización de este posgrado en conjunto con el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**.

A la **Dra. Norma Heredia**, al **Dr. Juan Francisco Contreras** y al **Dr. Carlos Hernández** por aceptar ser parte de este proyecto, dedicar su tiempo, aportar experiencia y por todo su apoyo durante estos tres años.

A la **Dra. Licet Villarreal Treviño** por su excelente dirección durante este doctorado, por su invaluable apoyo, paciencia, motivación y sus valiosas sugerencias desde el proceso de ingreso hasta la obtención del grado.

A la **Dra. Elvira Garza González** mi infinito agradecimiento por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación, por todo el aprendizaje, experiencia y valores transmitidos, por su excelente guía, por su gran ejemplo, paciencia, motivación, pero sobre todo por su comprensión más allá de lo implicado en este proyecto.

A todo el personal del laboratorio de bacteriología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” y al **M.S.P Jorge Llaca Díaz** por facilitar la fase experimental de este proyecto.

A **Lucy Acevedo** por su asesoramiento técnico durante la fase experimental de este proyecto y por brindar su experiencia profesional y personal.

A mis amigos y compañeros del posgrado: **Samantha Flores, Paola Bocanegra, Jessica Gutiérrez** y **Adrián Martínez** por los buenos momentos compartidos dentro y fuera de las actividades académicas.

A **Néstor Casillas** por ser parte importante en mi vida desde siempre, por estar ahí cuando más se necesitaba, por brindarme palabras de apoyo y motivación.

A toda mi **familia y amigos** por comprender las ausencias en momentos importantes y por apoyarme incondicionalmente.

A mis padres por creer en mí y brindarme lo mejor de sí.

DEDICATORIA

*A mis padres por darme la vida,
y a Dios por permitirme disfrutar de cada paso.*

ÍNDICE

SECCIÓN	Pág.
COMITÉ DE TESIS.....	i
DIRECCIÓN DE TESIS.....	ii
LUGAR DE TRABAJO.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v.
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Generalidades y antecedentes históricos.....	3
2.2. Características microbiológicas y hábitat.....	4
2.3. Epidemiología molecular y transmisión.....	8
2.4. Relevancia clínica y espectro clínico de infecciones.....	9
2.5. Factores de virulencia.....	10
2.5.1. Formación de biopelícula.....	12
2.6. Métodos de identificación.....	14
2.7. Resistencia a los antibióticos y el Casete Cromosómico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>).....	15
2.7.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos -lactámicos por la proteína PBP2a.....	17
2.7.2. Estructura básica del SCC <i>mec</i>	17
2.7.3. Complejo de genes <i>mec</i>	19
2.7.4. Complejo de genes <i>ccr</i>	21
2.7.5. Regiones de unión (J).....	22
2.7.6. Tipificación de SCC <i>mec</i>	23
2.8. SCC <i>mec</i> de <i>S. hominis</i> , <i>S. cohnii</i> y <i>S. sciuri</i>	23

2.9. Resistencia a los antibióticos y biopelícula.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVO.....	28
5.1. Objetivo general.....	28
5.2. Objetivos particulares.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1. Diseño experimental.....	29
6.2. Estrategia general.....	30
6.3. Aislamientos clínicos.....	31
6.4. Identificación.....	31
6.4.1. Identificación fenotípica.....	31
6.4.1.1. Gram.....	31
6.4.1.2. Catalasa.....	32
6.4.1.3. Coagulasa.....	32
6.4.1.4. Oxidasa.....	32
6.4.1.5. Sistema bioquímico: API Staph.....	33
6.4.2. Identificación molecular.....	34
6.4.2.1. Extracción de DNA genómico: método fenol-cloroformo.....	34
6.4.2.2. Amplificación del gen 16S rRNA.....	35
6.4.2.3. Purificación del producto de PCR.....	36
6.4.2.4. Secuenciación de análisis de datos del gen 16S rRNA.....	36
6.5. Resistencia a meticilina.....	37
6.5.1. Determinación con disco de cefoxitina.....	37
6.5.2. Determinación del gen <i>mecA</i>	38
6.6. Tipificación del SCC <i>mec</i>	39
6.6.1. Método de Zhang.....	40
6.6.2. Método de Kondo.....	40

6.7. Producción de biopelícula.....	44
6.8. Genes asociados a la producción de biopelícula.....	45
6.9. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos.....	46
6.9.1 Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas.....	46
6.9.2 Susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula.....	47
6.10. Relación clonal.....	48
6.11. Análisis estadístico.....	52
7. RESULTADOS.....	53
7.1. Identificación.....	53
7.2. Resistencia a meticilina.....	54
7.3. Tipificación del SCC <i>mec</i>	54
7.4. Producción de biopelícula y genes <i>icaABDC</i>	55
7.5. Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula.....	56
7.6. Relación clonal.....	60
8. DISCUSIÓN.....	64
9. CONCLUSIONES.....	75
10. PERSPECTIVAS.....	76
11. BIBLIOGRAFÍA.....	77
12. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	84
13. APÉNDICES.....	85
A. BASES DE DATOS	86
B. ARTÍCULO.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág
1. Factores de virulencia de los Estafilococos Coagulasa Negativos.....	11
2. Tipos de SCCmec descritos para <i>S. aureus</i> y las combinaciones de <i>mec</i> y <i>ccr</i> para cada tipo.....	19
3. Iniciadores empleados en la tipificación del SCCmec por el método de Zhang y cols.....	41
4. Iniciadores empleados en la tipificación del SCCmec por el método de Kondo y cols.....	42
5. Iniciadores para la amplificación de los genes <i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> , <i>icaR</i> e <i>icaD</i>	45
6. Aislamientos incluidos en el estudio de acuerdo a la identificación definitiva.....	53
7. Resultados de la tipificación del SCCmec de <i>S. hominis</i> , <i>S. cohnii</i> y <i>S. sciuri</i>	55
8. Resultados de la susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág
1. Características básicas de la estructura del SCC <i>mec</i>	18
2. Clases de complejos <i>mec</i> descritos para <i>S. aureus</i>	20
3. Representación de la homología entre los genes <i>ccr</i> y sus alotipos en <i>S. aureus</i>	21
4. Esquema de colores para la interpretación de las pruebas.....	34
5. Frecuencia de aislamientos resistentes a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de <i>S. hominis</i> , <i>S. cohnii</i> y <i>S. sciuri</i>	57
6. Asociación del índice de biopelícula con el incremento de la CMEB respecto a la CMI en <i>S. hominis</i>	59
7. Dendograma de la relación genética.....	62

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ECN	Estafilococos Coagulasa Negativos
SCC<i>mec</i>	Casete Cromosómico Estafilocócico <i>mec</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMEB	Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula
IB	Índice de Biopelícula
ESP	Sustancia Polimérica Extracelular
PIA	Adhesina Intracelular de Polisacárido
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
PFGE	Electroforesis en Gel de Campos Pulsados
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EDTA	Etilendiaminotetracetato
cols.	Colaboradores
pb	Pares de bases
kb	Kilobases
DO	Densidad óptica
nm	Nanómetros
v	Voltios
UV	Ultravioleta
L	Litros
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
pMol	Concentración en picomoles
mL	Mililitros
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

Staphylococcus hominis, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri* se encuentran clasificados dentro del grupo de los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN). Los ECN están entre los principales agentes causales de enfermedades asociadas a la atención de la salud, principalmente bacteriemias relacionadas con el uso de catéter. El principal factor de virulencia descrito para los ECN es la capacidad de producir biopelícula, en donde su formación está asociada a la colonización de dispositivos médicos y a un incremento en la resistencia a los antibióticos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la formación de biopelícula, los genes asociados a esta producción, la resistencia a meticilina, el tipo de SCC*mec*, la relación genética de los aislamientos y la determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula en aislamientos clínicos de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*. El estudio incluyó a 67 aislados de *S. hominis*, 23 *S. cohnii* y 11 *S. sciuri* provenientes de especímenes clínicos. La resistencia a la meticilina se evaluó con la prueba de disco de cefoxitina. La detección del gen *mecA* y SCC*mec* se realizó por PCRs múltiples. La relación genética se determinó por electroforesis en gel de campos pulsados. La formación de biopelícula se evaluó por tinción con violeta cristal y se determinó el índice de biopelículas (IB). La susceptibilidad a los antibióticos de las células planctónicas (concentración mínima inhibitoria, CMI) y las células del biopelícula (concentración mínima de erradicación de biopelícula, CMEB) se determinaron por el método de dilución en caldo. Los resultados indicaron que más del 85% de los aislamientos fueron resistentes a la meticilina y presentaron el gen *mecA* positivo. De los aislamientos *mecA* positivos, más del 66% presentaron un tipo de SCC*mec* diferente al descrito para *S. aureus*. La clonalidad en general fue baja, pero se detectaron al menos tres clonas en cada especie, las cuales incluyeron de dos a ocho aislamientos. Más del 80% de los aislamientos se clasificaron como productores de biopelícula y el 91% de los aislamientos de *S. hominis* presentaron una fuerte producción de esta. Más del 60% de los aislamientos presentaron el gen *icaD*. Se observó que a mayor IB, mayor fue el valor de CMEB respecto al de CMI para amikacina, vancomicina, linezolid, oxacilina, ciprofloxacina y cloranfenicol. En conclusión, los aislamientos de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri* presentaron una frecuencia alta de resistencia a meticilina y a otros antibióticos. La mayoría de los tipos de SCC*mec* detectados fueron diferentes a los descritos para *S. aureus*. Se encontró baja clonalidad. Los resultados indican que las tres especies son formadoras de biopelícula y *S. hominis* es un productor fuerte. La producción de biopelícula se asoció con un incremento en la resistencia a los antibióticos.

ABSTRACT

Staphylococcus hominis, *Staphylococcus* and *Staphylococcus cohnii sciuri* are classified in the group of Coagulase-Negative *Staphylococci* (CoNS). CoNS are associated with health care infections, mainly bacteremia associated with catheter. The major virulence factor described for CoNS is the ability to produce biofilm. Biofilm production is associated with the colonization of medical devices and an increase in antibiotic resistance. The aim of this study was to characterize the biofilm formation, genes associated with this production, methicillin resistance, SCC*mec* type, genetic relatedness and antibiotic susceptibility in planktonic cells and biofilm cells in clinical isolates of *S. hominis*, *S. cohnii* and *S. sciuri*. The study included 67 *S. hominis*, *S. cohnii* 23 and 11 *S. sciuri* isolates from clinical specimens. Methicillin resistance was evaluated by the cefoxitin disk test. *mecA* and SCC*mec* were detected by PCR multiplex. Genetic relatedness was determined by pulsed field gel electrophoresis. Biofilm formation was assessed by crystal violet staining and biofilm index (IB) was determined. The antibiotic susceptibility of planktonic cells (minimum inhibitory concentration, MIC) and biofilm cells (minimum biofilm eradication concentration, MBEC) were determined by the broth dilution method. More than 85% of the isolates were resistant to methicillin and *mecA* gene positive. *mecA* positive isolates. Among *mecA*-positive isolates, the 66% presented SCC*mec* non-typeable. In the main, the clonality was low, however at least three clones were found in each species, which included two to eight isolates. Over 80% of isolates were classified as biofilm producers and *S. hominis* presented 91% of the isolates as strong producers. Over 60% of the isolates presented the *icaD* gene. Higher BI and MBEC values than the MIC values were observed for amikacin, vancomycin, linezolid, oxacillin, ciprofloxacin, and chloramphenicol. In conclusion, *S. hominis*, *S. cohnii* and *S. sciuri* presented a high rate of resistance to methicillin and other antibiotics. Most of the detected SCC*mec* types were different than those described for *S. aureus*. isolates indicated low clonality. The results indicate that the three species are biofilm producers and *S. hominis* is a strong producer. Biofilm production is associated with increased antibiotic resistance.

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus hominis, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri* se encuentran clasificados dentro del grupo de los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN). Los ECN están entre los principales agentes causales de un amplio espectro de infecciones nosocomiales, entre las que se encuentran la endocarditis, osteomielitis, endoftalmitis posquirúrgica, y bacteriemias; todas ellas asociadas principalmente al uso de dispositivos médicos como catéteres intravenosos, de diálisis peritoneal, válvulas cardíacas, entre otros (Casey *et al.* 2007; Rogers *et al.* 2009). Los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos reportaron en 2008 que los ECN fueron el grupo de microorganismos aislados con mayor frecuencia en distintas infecciones nosocomiales (Hidron *et al.* 2008; Magill *et al.* 2014).

El principal factor de riesgo que predispone a una infección causada por alguna especie de los ECN es el uso de dispositivos médicos. Los pacientes con cáncer tienen predisposición a presentar una infección por este microorganismo, debido al uso constante de dispositivos que son necesarios para la administración de quimioterapia. En general, todos los individuos con un sistema inmunológico deficiente como los neonatos, pacientes trasplantados o con patologías propias del sistema inmune están en riesgo de cursar por una infección causada por alguna especie de ECN (Becker *et al.* 2014).

En la literatura no se cuenta con reportes de estudios sobre los factores de virulencia específicamente de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*; sin embargo, existen trabajos donde se investigaron los factores de virulencia, de manera conjunta entre las especies de los ECN, en los que se determinó que este grupo de microorganismos es capaz colonizar, lesionar y destruir los tejidos del hospedero, además de evadir la respuesta primaria del sistema inmunológico y producir moléculas de adhesión asociadas a la fijación del microorganismo hacia ciertas proteínas de la célula hospedadora (Rogers *et al.* 2009).

Cabe destacar que el principal factor de virulencia descrito para los ECN es la capacidad de producir biopelícula. Este factor de virulencia permite la adhesión de los microorganismos hacia los materiales de los que están hechos los dispositivos médicos, como el poliestireno y la acumulación de células bacterianas así como a la nutrición de las mismas (Becker *et al.* 2014; Osman *et al.* 2015). El nivel de producción de biopelícula de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* aún no ha sido definido en la literatura.

Uno de los problemas que dificulta el tratamiento de las infecciones por los ECN, es la elevada frecuencia de resistencia a los antibióticos. La resistencia a meticilina y a un amplio número de antibióticos en los ECN se asocia a la presencia de un fragmento de DNA exógeno llamado casete cromosómico estafilocócico *mec*. Se ha reportado la presencia del SCC*mec* en los ECN con una frecuencia a nivel mundial del 75% al 90% (Hanssen y Ericson Sollid 2006; Zong *et al.* 2011).

La formación de biopelícula además de asociarse con la colonización de dispositivos médicos, también se ha asociado a un incremento en la resistencia a los antibióticos, este hecho se ha reportado en algunas especies bacterianas incluidas algunas de ECN (Hoiby *et al.* 2010; Qu *et al.* 2010; Sommerfeld Ross *et al.* 2012).

Algunos estudios reportaron que la resistencia a los antibióticos en células formadoras de biopelícula es de 100 a 1000 veces mayor que en células planctónicas de bacterias Gram negativas (Davies 2003; Tre-Hardy *et al.* 2008; Hoiby *et al.* 2010). El tratamiento con antibióticos basado en los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* diseñados para las células planctónicas, en ocasiones no logra erradicar las infecciones por ECN productores de biopelícula, resultando en infecciones crónicas y la necesidad de retirar los dispositivos médicos colonizados en donde algunos requieren extirpación quirúrgica. Por lo tanto, para este tipo de infecciones sería más apropiado basar el tratamiento en los perfiles de susceptibilidad de los ECN dentro de la biopelícula (Qu *et al.* 2010; Sommerfeld Ross *et al.* 2012).

2. ANTECEDENTES

Staphylococcus hominis, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri*

2.1 Generalidades y antecedentes históricos

S. hominis, *S. cohnii* y *S. sciuri* son especies bacterianas de relevancia clínica a nivel nosocomial y se encuentran clasificadas dentro del grupo de los ECN. Este grupo de microorganismos incluye actualmente más de 40 especies; sin embargo, solo algunas tienen importancia médica, entre las cuales se encuentran *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. lugdunensis* y *S. warneri*.

S. hominis y *S. cohnii* fueron descritos por primera vez en 1975 y *S. sciuri* fue descrito en 1976 por Kloos, y Schleifer tras algunos trabajos de investigación sobre la microbiota de piel de humanos (Kloos y Schleifer 1975; Schleifer 1975; Kloos 1976). En 1980, estos mismos investigadores reportaron a *S. hominis* como la segunda especie de ECN más abundante en la piel de humanos sanos, precedido solo por *S. epidermidis* (Kloos 1980). En 1998, se describieron dos subespecies para este microorganismo: *S. hominis* subsp. *hominis* y *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, en donde para esta última surgió la hipótesis de presentar una mayor resistencia a los antibióticos (Kloos *et al.* 1998).

Para *S. cohnii* también se han descrito dos subespecies de importancia médica: *S. cohnii* subsp. *cohnii* y *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, siendo esta última la asociada con mayor frecuencia a infecciones intrahospitalarias complicadas debido a la resistencia a los antibióticos (Schleifer 1975; Zong y Lu 2010).

S. sciuri fue considerado por muchos años como un patógeno oportunista de animales principalmente de granja. Sin embargo, en la última década el incremento de infecciones asociadas al cuidado de la salud causadas por este microorganismo han generado un mayor número de investigaciones de esta especie. Se han descrito dos subespecies: *S. sciuri* subsp. *sciuri* y *S. sciuri* subsp. *lentus*, ésta última reconocida principalmente como reservorio de genes de resistencia a los antibióticos y común en animales de granja (Kloos 1976; Couto *et al.* 1996; Couto *et al.* 2000; d'Azevedo *et al.* 2008).

2.2 Características microbiológicas y hábitat

Las especies incluidas en el grupo de los ECN comparten características fenotípicas que los identifican como cocos Gram positivos de aproximadamente 1.3 µm de diámetro, son catalasa positivos, coagulasa negativos y con excepción de *S. sciuri* son oxidasa negativos (Becker *et al.* 2014). Para su cultivo no se requieren de nutrientes especiales, crecen bien en condiciones aeróbicas y en agar sangre, forman colonias circulares, cremosas, blanquecinas, de bordes regulares y textura lisa, generalmente de 1-2 mm de diámetro, tras una incubación de 24 h a 37°C (Kloos y Schleifer 1975; Casey *et al.* 2007). *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* comparten las características ya mencionadas; sin embargo, la observación del Gram, del desarrollo colonial y de las pruebas bioquímicas marcan las diferencias entre estas tres especies tal como se describe a continuación (Becker *et al.* 2014).

S. hominis. En la tinción de Gram las células se observan como cocos Gram positivos, de 1.0 a 1.5 µm de diámetro, inmóviles, no formadoras de esporas, con un arreglo predominante en tétradas y ocasionalmente en pares. Las colonias en un agar sangre se observan ligeramente elevadas del centro, y con la edad por lo general desarrollan un borde biselado con mayor elevación en el centro. Las colonias son de 3 a 4 mm de diámetro, lisas, sin brillo y pueden presentar un ligero pigmento amarillento o gris-blanco. Las colonias más antiguas (2-6 días) presentan anillos concéntricos con pigmentación oscura. El desarrollo como anaerobio facultativo es limitado ya que solo un

bajo porcentaje de las cepas son viables en condiciones anaeróbicas. En aerobiosis este microorganismo produce rápidamente ácido a partir de glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y glicerol. El 90% de las cepas producen ácido a partir de trealosa, el 81% a partir de turanosa, 60% a partir de lactosa, 52% a partir de galactosa, y 51% de melezitosa. Solo el 7% de las cepas producen ácido a partir de manitol, y 10% a partir de manosa. Esta especie no produce ácido a partir de ramnosa, xilosa, arabinosa, ribosa, gentiobiosa, celobiosa, xilitol, sorbitol, inositol, salicina, adonitol, dulcitol, arabitol, eritritol, eritrosa, rafinosa, melibiosa, fucosa, tagatosa, lixosa, o sorbosa. *S. hominis* presenta resistencia a la lisozima y son ligeramente resistentes a la lisostafina (CMI: 100 a 200 µg/mL)(Kloos y Schleifer 1975).

S. cohnii. En la tinción de Gram, se observan cocos Gram positivos de 0.5 a 1.2 µm de diámetro, predominantemente por separado o en pares, las tétradas se encuentran con frecuencia baja. Son células inmóviles y no formadoras de esporas. Las colonias son ligeramente convexas y algunas pueden presentar centros deprimidos, circulares de 4.0 a 7.5 mm de diámetro, textura lisa, brillante y por lo general sin pigmento. El 24 % de las cepas puede desarrollarse en condiciones de anaerobiosis. Todas las cepas crecen bien en los medios que contiene hasta 10% de NaCl y un 64% de las cepas no tolera un 15% de NaCl. Todas las cepas presentan capacidad para crecer desde los 15°C hasta los 45°C; solamente un 7% de las cepas no puede crecer a 45°C. El 31% de las cepas ha demostrado una actividad hemolítica débil y el 55% de las cepas no produce hemólisis. Alrededor del 20% de las cepas producen débilmente fosfatasa y el 38% muestra actividad bacteriolítica. Todas las cepas producen ácido a partir de glucosa, fructosa, trehalosa, y glicerol en condiciones aeróbicas. Alrededor del 80% de las cepas produce ácido a partir de manosa, maltosa, y manitol. Algunas cepas producen ácido a partir de la lactosa (31%) y xilitol (38%). Muy pocas cepas pueden producir ácido a partir de sacarosa (12%) o galactosa (10%). *S. cohnii* no produce ácido a partir de ramnosa, xilosa, arabinosa, ribosa, turanosa, gentiobiosa, celobiosa, melezitosa, sorbitol, inositol, salicina, adonitol, dulcitol, arabitol, eritritol, eritrosa, rafinosa, melibiosa, fucosa, tagatosa, lixosa, o sorbosa. Todas las cepas son susceptibles a lisostafina y resistentes a la lisozima (Schleifer 1975).

S. sciuri. En la tinción de Gram se observan cocos Gram positivos de 0.7 a 1.2 μm de diámetro, no móviles, y no formadores de esporas, generalmente de manera individual, en pares o tétradas. Las tétradas de células se observan con mayor frecuencia en *S. sciuri* subsp. *lentus*. Las colonias de las dos subespecies son diferentes. *S. sciuri* subsp. *sciuri* en un agar P desarrolla colonias de 7 a 11 mm de diámetro, circulares, lisas, brillantes y las colonias envejecidas presentan elevación del centro. El borde de las colonias del 86% de las cepas es ligeramente ondulado. La mayoría de las colonias presenta un color gris-blanco a amarillento. El pigmento se intensifica considerablemente durante el crecimiento a temperaturas bajas (15 a 20°C). Las colonias de *S. sciuri* subsp. *lentus* son más pequeñas (2.2 a 3 mm de diámetro), circulares, lisas, brillantes, de apariencia húmeda y convexas. El borde de las colonias del 67% de las cepas fue ligeramente ondulado. Todas las cepas presentan colonias color blanco grisáceo. El crecimiento de *S. sciuri* subsp. *sciuri* en condiciones aeróbicas se presenta en todas las cepas, y el 91% de las cepas pueden desarrollarse en la porción anaerobia de un medio semisólido de tioglicolato. El crecimiento de *S. sciuri* subsp. *lentus* se produce en condiciones aeróbicas y el 11% de las cepas pueden desarrollarse en medio tioglicolato en anaerobiosis. Ambas subespecies crecen bien con NaCl en concentraciones hasta del 10%, aunque *S. sciuri* subsp. *lentus*, requiere mayor tiempo para su crecimiento, de 72 a 96 h de incubación. El crecimiento de ambas subespecies es inhibido con concentraciones superiores al 15% de NaCl. El rango de temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 35°C. Esta especie tiene la capacidad de reducir los nitratos y mostrar actividad débil de fosfatasa. En comparación con otros estafilococos, *S. sciuri* produce ácido a partir de una gama muy amplia de hidratos de carbono. Todas las cepas de esta especie producen ácido en condiciones aerobias a partir de D-(+)-glucosa, β -D-(-)-fructosa, D-(-)-ribosa, D-(+)-celobiosa, y D-manitol; además un 68% de las cepas producen de pequeñas a moderadas cantidades de ácido a partir de maltosa. Todos las cepas de *S. sciuri* subsp. *sciuri* produce ácido de D-(+)-galactasa, D-(+)-fucosa, sacarosa y glicerol. Todas las cepas de *S. sciuri* subsp. *lentus* producen ácido a partir de D-(+)-manosa, sacarosa, D-(+)-trehalosa, salicina, y β -gentiobiosa. El 91% de las cepas de *S. sciuri* subsp. *sciuri* cepas producen ácido a partir de D-(+)-trehalosa y β -gentiobiosa, el 77% produce ácido partir de D-sorbitol, 71% a partir de la salicina, un 49% a partir de D-(+)-melezitosa, 37% a partir de L-(+)-arabinosa, 31% produce pequeñas

cantidades de ácido a partir de D-(+)-manosa, y 23% a partir de L-(+)-ramnosa. El 78% de las cepas de *S. sciuri* subsp. *lentus* produce ácido a partir de L-(+) arabinosa, D-(+) -galactosa, α -lactosa, L-(+)-rhamnose, y D-sorbitol, y pequeñas a moderadas cantidades de ácido de D-(+)-fucosa y glicerol. Todas las cepas son resistentes a lisozima. El 27% de las cepas de *S. sciuri* subsp. *sciuri* son susceptibles a la lisostafina (CMI: 25 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el 73% presentan ligera resistencia a la lisostafina (CMI: 100-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todas las cepas de *S. sciuri* subsp. *lentus* son susceptibles a la lisostafina (CMI: 12.5 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Kloos 1976).

S. hominis, *S. cohnii* y *S. sciuri* colonizan la piel y mucosas de humanos y *S. hominis* es la especie predominante de estas tres. (Kloos 1980; Kloos *et al.* 1998). Se ha calculado que en conjunto, las especies de ECN están presentes en la piel de humanos sanos en una cantidad que puede llegar hasta las 100,000 UFC/cm² de piel (Rogers *et al.* 2009). La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y las diferencias en el espesor y densidad de la piel, de los pliegues, de los folículos pilosos y glándulas definen hábitats distintos que determinan la variación y diversidad de la microbiota. La colonización de la piel por los ECN es distinta de acuerdo a factores relacionados con la edad, por ejemplo, la población de ECN no es la misma en neonatos que en adultos. De acuerdo con datos de los primeros estudios mediante cultivo y a los análisis de metagenómica recientes, los ECN en general prefieren los sitios corporales de mayor humedad. Tales sitios húmedos incluyen las axilas, el ombligo, la región inguinal, la glútea, la antecubital, la poplíteo y la plantar. Además, la porción anterior de la nariz es colonizada constantemente por los ECN. Del mismo modo, se pueden encontrar en la superficie ocular y la conjuntiva. Aún se desconoce el beneficio que la colonización de los ECN pueda brindar al hospedero; sin embargo, se ha demostrado que un subconjunto de serina proteasa Esp secretoras de algunas cepas de *S. epidermidis* son capaces de inhibir y destruir células de *S. aureus*, y así prevenir la colonización y formación de biopelícula de este importante patógeno (Rogers *et al.* 2009; Becker *et al.* 2014).

2.3. Epidemiología molecular y transmisión

La diversidad clonal varía entre las especies de los ECN y ha sido menos estudiada que la de *S. aureus*. Mientras que la especie más estudiada de los ECN *S. epidermidis* se caracteriza por una pronunciada diversidad genómica, otras especies de ECN, han mostrado menor diversidad en la tipificación por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) (Bouchami *et al.* 2011b; Szczuka *et al.* 2014). Actualmente, la tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés) ha revelado que las clonas circulantes en el ambiente hospitalario presentan diferencias con las circulantes en la comunidad (Zhang *et al.* 2013; Becker *et al.* 2014).

Diversos estudios sobre la epidemiología molecular de los ECN han puesto de manifiesto la recombinación genética de los distintas clonas mediante la transferencia de elementos genéticos móviles tales como el Casete Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (Caierao *et al.* 2004; Bouchami *et al.* 2011b; Zong *et al.* 2011).

Para la vigilancia a corto plazo de la transmisión hospitalaria de los ECN se recomienda el estudio del genoma bacteriano completo mediante PFGE. La metodología por MLST se recomienda para la vigilancia de la evolución de los cromosomas a largo plazo y su distribución geográfica (Zhang *et al.* 2013; Becker *et al.* 2014).

En el caso de los ECN resistentes a la meticilina, se recomienda la tipificación del SCC*mec*. La secuenciación del genoma completo mejorará drásticamente el conocimiento respecto a la organización genética de las especies de ECN así como su divergencia con las especies de *S. aureus* (Jiang *et al.* 2012; Becker *et al.* 2014).

En comparación con *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), se conoce mucho menos de la epidemiología molecular de los ECN. Sin embargo, los reportes de ECN resistentes a múltiples fármacos, así como su capacidad de formar biopelícula y su posible potencial para causar brotes se han reportado cada vez con mayor frecuencia.

La transmisión intrahospitalaria y brotes causados por *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* se ha reportado con frecuencia alta en unidades de cuidados intensivos, particularmente en neonatos (Couto *et al.* 2000; d'Azevedo *et al.* 2008; Ruiz de Gopegui *et al.* 2011). De igual manera que la mayoría de los patógenos asociados a la atención de la salud, los factores relacionados con la higiene de manos, la desinfección y/o esterilización de instrumentación médica y de superficies puede disminuir la transmisión intrahospitalaria y propagación clonal de los ECN (Larson *et al.* 1998).

2.4 Relevancia clínica y espectro clínico de infecciones

Debido a que los ECN forman parte de la microbiota normal de la piel de humanos, durante mucho tiempo este grupo de microorganismos fue considerado solamente como agentes contaminantes de medios de cultivos; sin embargo, desde hace dos décadas emergieron a nivel mundial como importantes patógenos oportunistas (Fleer y Verhoef 1984; Huebner y Goldmann 1999; Sarvikivi *et al.* 2008). Actualmente los ECN representan uno de los principales agentes causales de un amplio espectro de infecciones nosocomiales, entre las que se encuentran la endocarditis, la osteomielitis, la endoftalmitis posquirúrgica, la bacteriemia; todas estas asociadas principalmente al uso de dispositivos médicos como catéteres intravenosos, de diálisis peritoneal, válvulas cardiacas, entre otros (Huebner y Goldmann 1999; Chu *et al.* 2004; Casey *et al.* 2007). Los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos reportaron en el 2008, que los ECN fueron el grupo de microorganismos aislados con mayor frecuencia en distintas infecciones nosocomiales (Hidron *et al.* 2008).

S. hominis, *S. cohnii* y *S. sciuri*, son especies aisladas con frecuencia de hemocultivos provenientes de neonatos y pacientes con cáncer, es por ello que estos microorganismos se asocian principalmente a bacteriemias en pacientes inmunodeprimidos (Chaves *et al.* 2005; d'Azevedo *et al.* 2008; Palazzo *et al.* 2008; Al Wohoush *et al.* 2011). También existen reportes aislados, pero cada vez con mayor frecuencia, donde se asocia a estas tres especies como agentes causales de endoftalmitis y endocarditis (Iyer *et al.* 2005; Cunha *et al.* 2007).

No hay datos de la incidencia y prevalencia de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* como agentes causales de infecciones asociadas a la atención de la salud, esto debido a que en la mayoría de los laboratorios clínicos, la identificación se realiza solamente hasta nivel de género agrupando a los ECN, y por consecuencia los datos con los que se cuenta engloban a todas las especies de este grupo de microorganismos.

Los principales factores de riesgo que predisponen a una infección causada por *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* es la hospitalización por tiempos prolongados, sobre todo en las unidades donde los pacientes requieren el uso de dispositivos médicos como ventiladores pulmonares, catéteres intravenosos, catéteres de diálisis peritoneal, así como los implantes permanentes válvulas cardíacas y/o algún tipo de prótesis (Huebner y Goldmann 1999; Casey *et al.* 2007; Rogers *et al.* 2009). Los pacientes con cáncer tienen predisposición a presentar una infección por este microorganismo, debido al uso constante de dispositivos que son necesarios para la administración de fármacos quimioterapéuticos. En general todos los individuos con un sistema inmunológico deficiente como los neonatos, pacientes trasplantados o con patologías propias del sistema inmune están en riesgo de cursar por una infección causada por éstas tres especies de ECN (Chaves *et al.* 2005; Al Wohoush *et al.* 2011).

2.5 Factores de virulencia

En la literatura no se cuenta con reportes de estudios sobre los factores de virulencia específicamente para *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*; sin embargo, existen trabajos donde se investigaron dichos factores de manera conjunta entre las especies de los ECN, en los que se determinó que este grupo de microorganismos es capaz de producir: lipasas, toxinas-delta y proteasas las cuales contribuyen a la colonización, lesión y destrucción de los tejidos del hospedero respectivamente; enzima modificadora de ácidos grasos que inactiva los ácidos grasos que se encuentran en la piel; ácido poli-D-glutámico que permite la evasión de la respuesta primaria del sistema inmunológico; moléculas de adhesión asociadas a la fijación del microorganismo hacia ciertas proteínas de la célula hospedadora como la elastina, colágeno, fibrinógeno y fibronectina (Huebner y Goldmann 1999; Casey

et al. 2007; Becker *et al.* 2014). Estos factores de virulencia y su asociación genética se enlistan en la tabla 1. Los factores de virulencia de los ECN son pocos comparados con los de la especie patógena *S. aureus*. Sin embargo, la producción de biopelícula es suficiente para que los ECN puedan colonizar y causar infecciones, por lo tanto este factor de virulencia se describe como el principal de este grupo de microorganismos.

Tabla 1. Factores de virulencia de los Estafilococos Coagulasa Negativos (Rogers *et al.* 2009).

Factor de virulencia	Mecanismos	Gen (s)
Biopelícula	Evasión del sistema inmunológico y tolerancia a los antibióticos	
PIA	Componente polisacárido	<i>icaADBC</i>
Aap	Acumulación de células de biofilm	<i>aap</i>
Bhp	Acumulación de células de biopelícula	<i>php</i>
DNA	Estructura de biopelícula, nutrientes y transferencia horizontal de genes	NA
Moléculas adhesinas	Adherencia a proteínas del hospedero o a superficies abióticas.	
Aae	Unión al fibrinógeno, vitronectina y fibronectina	<i>ae</i>
AtIE	Unión a la vitronectina	<i>atIE</i>
Bhp	Unión al poliestireno	<i>bhp</i>
Ebp	Unión a la elastina	<i>ebp</i>
Emnp	Unión a la fibronectina	<i>empB</i>
Fbe (SdrG)	Unión a la fibrinógeno	<i>sdrG</i>
GehD	Unión al colágeno	<i>gehD</i>
ScaA (Aae)	Unión al fibrinógeno, vitronectina y fibronectina	<i>scaA</i>
ScaB	ligando desconocido	<i>scaB</i>
SdrF	Unión al colágeno	<i>sdrF</i>
SdrG (Fbe)	Unión al fibrinógeno	<i>sdrG</i>
Ssp-1	Unión al poliestireno	desconocido
Ssp-2	Unión al poliestireno	desconocido
ácido teicoico	Unión a la fibronectina	<i>tagF, yibD</i>
Otros factores	Varios mecanismos	
Peptidoglicano/ácido teicoico	Estimulación de producción de citoquinas	<i>tagF, femA</i>
Modulinas solubles en fenol	Inducción de citoquinas, modulación del sistema inmunológico, dispersión de biopelícula	<i>psmA, pmsB, pmsD, psmY</i>
Ácido poli-D-glutámico	Evasión del sistema inmunológico, apoyo en la resistencia de antimicrobianos	<i>cap</i> locus
Toxina Delta	Lesiones a las células del hospedero	<i>hld</i>
Exoenzimas	Lesiones a las células del hospedero	<i>hld</i>
Ácidos grasos modificadores de enzimas	Inactivación de los ácidos grasos de la piel	desconocido
Lipasas	Colonización de piel y heridas	<i>gehC, gehD</i>
Proteasas	Destrucción de los tejidos del hospedero	<i>sspA, sspB, sspC</i>

2.5.1. Formación de biopelícula

La biopelícula es una población o comunidad de bacterias que viven en estructuras organizadas en una interfase líquida. En una biopelícula las bacterias viven en grupos celulares o microcolonias que están encapsulados en una matriz compuesta de una sustancia polimérica extracelular (EPS), en la cual hay separaciones por canales de agua abiertos que actúan como un sistema circulatorio primitivo para el suministro de nutrientes y la eliminación de productos metabólicos de desecho. Dentro de una biopelícula, cada célula bacteriana ocupa un microambiente específico, que se determina por las células circundantes, la proximidad a un canal (los cuales determinan el pH, la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno) y la matriz de EPS (Davies 2003; Hall-Stoodley *et al.* 2004).

La capacidad de producir biopelícula le permite a las células bacterianas la adherencia a los materiales inertes como el poliestireno, así como la acumulación de y nutrición de las mismas (Christensen *et al.* 1985; Davey y O'Toole G 2000; Stewart y Costerton 2001).

El espectro de enfermedades que involucran producción de biopelículas bacterianas es amplio, en este se encuentran la colitis, vaginitis, uretritis, conjuntivitis, gingivitis y otitis. Además, uno de los principales problemas asociados a las biopelículas bacterianas es la colonización dispositivos médicos, como sondas urinarias, catéteres arteriales y venosos, respiradores, sigmoidoscopios, lentes de contacto, implantes (válvulas cardíacas, marcapasos, dispositivos de asistencia ventricular, injertos vasculares sintéticos y stents), prótesis urinarias y prótesis ortopédicas (como las articulaciones y los pasadores artificiales) (Hall-Stoodley *et al.* 2004; Becker *et al.* 2014). Incluso la formación de biopelícula se ha asociado a la resistencia hacia los antibióticos (Stewart y Costerton 2001; Davies 2003; Hoiby *et al.* 2010). De acuerdo con una publicación de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. (NIH, por sus siglas en inglés), las biopelículas son un problema médico importante debido a que se asocian con más del 80% de las infecciones microbianas en el cuerpo (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

El primer paso para que los ECN puedan establecer la colonización y/o infección, es la adhesión. Esta adhesión puede ser hacia superficies de dispositivos médicos y posteriormente a las células del hospedero. La formación de una multicapa de biopelícula sobre la superficie de un dispositivo médico de poliestireno se ha considerado como un factor crítico en la patogénesis de las infecciones exógenas por ECN. *S. epidermidis* es la especie recuperada con mayor frecuencia en infecciones asociadas a la producción de biopelícula y los mecanismos de este factor de virulencia han sido ampliamente estudiados en esta especie. La infección por los estafilococos puede ser frecuentemente considerada como endógena, es decir, causada por la propia microbiota del paciente. Esto probablemente se produce durante de la inserción de un dispositivo en el cuerpo en donde se inocula un pequeño número de bacterias de procedentes de las mucosas o piel del paciente (Davey y O'Toole G 2000; Djeribi *et al.* 2012).

Los miembros del género *Staphylococcus* producen diversas adhesinas proteicas y no proteicas para mediar la adherencia de las células bacterianas hacia las superficies. Entre las adhesinas proteicas se encuentran las proteínas ancladas covalentemente a la superficie, también denominadas proteínas ancladas a la pared celular, proteínas asociadas no-covalentemente a la superficie, éstas incluyen las autolisinas y proteínas de membrana.

Las adhesinas no proteicas son la adhesina intracelular de polisacárido (PIA), también conocida como poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG), así como la pared de ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Osman *et al.* 2015).

La actividad biológica de PIA/PNAG en la formación de biopelículas y evasión del sistema inmunológico está determinada por su carga positiva, lo que resulta en la desacetilación parcial de los residuos *N*-acetilglucosamina, mediada por el gen *icaB*. En *S. epidermidis* se ha determinado que la adhesión y la producción de PIA / PNAG están asociados en a los genes *icaADBC*, los cuales están organizados en un operón. El gen *icaA* confiere la actividad baja de transferasa a la *N*-acetilglucosamina. La coexpresión de la enzima catalítica codificada por el gen *icaA* junto con la codificada por el gen *icaD* incrementa significativamente la actividad y producción de oligómeros de *N*-

acetilglucosamina. El gen *icaB* codifica una enzima de superficie celular que cataliza la desacetilación parcial de los residuos de *N*-acetilglucosamina (Becker *et al.* 2014; Osman *et al.* 2015).

Los genes del operon *icaADBC* se han identificado en aislamientos clínicos productores de biopelícula de algunas especies de ECN además de *S. epidermidis*, tales como *S. haemolyticus* y *S. lugdunensis*. Sin embargo, también se ha reportado que la producción de PIA/PNAG no ha correlacionado con la presencia del operon *icaADBC* en aislamientos clínicos de *S. capitis*, *S. hominis* y *S. warneri* (Davey y O'Toole G 2000; Becker *et al.* 2014).

2.6 Métodos de Identificación

La mayoría de los laboratorios clínicos donde las pruebas se realizan de manera manual, los ECN se identifican solo a nivel de grupo de especies, y para ello realizan una tinción de Gram, una prueba de catalasa para identificar al género *Staphylococcus*, y la prueba para diferenciar a la especie patógena *S. aureus* del resto que pertenece a este género, se realiza la prueba de coagulasa, si esta es negativa se reporta un ECN. Para realizar la identificación bioquímica a nivel especie, las pruebas que se realizan se basan en la asimilación de carbohidratos, y para ello se dispone en el mercado de una gran diversidad de sistemas comerciales automatizados y semi-automatizados que ofrecen una batería de pruebas que contienen los diferentes sustratos por los cuales se pueden discriminar las especies de este género. Entre los que se encuentran los sistemas Vitek, MicroScan, Sensititre y API, donde este último ha demostrado ser el sistema con menor número de errores en la identificación bioquímica de acuerdo a lo reportado en diversos estudios, en los cuales la precisión y exactitud de dichos sistemas comerciales han sido evaluados y comparados entre sí (Layer *et al.* 2006; Brigante *et al.* 2008; Garza-Gonzalez *et al.* 2010c).

Debido a la relación filogenética que existe entre las especies del género *Staphylococcus*, estas presentan una homología en la asimilación de los distintos

carbohidratos, y esto es lógico si se aborda la situación desde el punto de vista que todas ellas habitan en la piel y mucosas de humanos de manera normal, por lo que la identificación a nivel especie basándose en pruebas bioquímicas representa un reto; incluso en métodos automatizados. Adicionalmente, la identificación de algunas especies de ECN ha sido reportada como discordante cuando se compara con métodos moleculares (Gilad y Schwartz 2007).

En cuanto a la identificación molecular, se ha recurrido a ensayos de PCR en tiempo real y a la secuenciación de los genes 16S rRNA, *sodA*, *hsp60*, *rpoB* y *tuf* para los cuales también se han realizado trabajos de comparación y de relación filogenética entre las especies, ya que existe una alta homología en algunos genes conservados para ciertas especies del género (Martineau *et al.* 2001; Mellmann *et al.* 2006; Ghebremedhin *et al.* 2008).

Por lo anterior, y de acuerdo a los resultados de investigación donde se comparan los métodos fenotípicos con los moleculares, actualmente para lograr la identificación a nivel especie de los ECN, se recurre a la combinación de pruebas bioquímicas y pruebas moleculares, siendo el sistema API y la secuencia 16S rRNA las pruebas más utilizadas (Heikens *et al.* 2005; Garza-Gonzalez *et al.* 2010c).

2.7 Resistencia a los antibióticos y el Casete Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Uno de los principales problemas que dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*, entre otras especies de ECN, es la resistencia elevada a diversos antibióticos que presenta este grupo de microorganismos (Fitzgibbon *et al.* 2001; Petinaki *et al.* 2005; Koksall *et al.* 2009; Mulanovich *et al.* 2010). En particular, estas tres especies cuentan con algunos reportes de resistencia a linezolid, un antibiótico de reciente aprobación por la FDA (año 2010) y que es considerado como de último recurso (Sorlozano *et al.* 2010; Ruiz de Gopegui *et al.* 2011).

Desde 1960, con la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) al poco tiempo después de la introducción de este antibiótico en la práctica clínica, se prestó especial atención al problema de la resistencia a los antimicrobianos (Archer y Niemeyer 1994; Wu *et al.* 1996; Ito y Hiramatsu 1997; 1998). Sin embargo, no fue hasta el año 2000 que se elucidó que la resistencia a la clase de antibióticos beta-lactámicos estaba dada por una proteína llamada PBP2a la cual es codificada por el gen *mecA*, el cual reside dentro de una especie de isla patógena, que corresponde a un fragmento de DNA exógeno llamado casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), el cual en un principio, en el trabajo publicado por Katayama Y. y colaboradores fue denominado solo como DNA de resistencia en *S. aureus* (Katayama *et al.* 2000).

Con el paso del tiempo a la par de los constantes reportes de ECN como patógenos emergentes en nosocomios y además multidrogoresistentes, se comenzó a estudiar este grupo de microorganismos y se demostró la existencia de este casete dentro de su genoma (Mombach *et al.* 2007; Ibrahim *et al.* 2009; Garza-Gonzalez *et al.* 2010a; Garza-Gonzalez *et al.* 2010b; Zong *et al.* 2011). Los resultados de trabajos de investigación recientes muestran evidencias que sustentan la hipótesis de que este elemento genético fue transferido de manera horizontal de los ECN hacia las cepas de *S. aureus* y no en sentido contrario como se pensó en un principio (Hanssen *et al.* 2004).

La prevalencia de resistencia a la meticilina, el cual es marcador de la presencia del SCC*mec*, se ha reportado mayor frecuencia en los ECN que en *S. aureus*, con tasas que van del 75% al 90% a nivel mundial. (Hanssen y Ericson Sollid 2006). Entre las especies de ECN que poseen el SCC*mec* se han descrito *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. conhii*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. warneri*, y *S. saprophyticus* (Jamaluddin *et al.* 2008; Ruppe *et al.* 2009; Soderquist y Berglund 2009; Bouchami *et al.* 2011a; b).

2.7.1 Mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos por la proteína PBP2a

La resistencia a esta clase de antibióticos es nombrada comúnmente como resistencia a meticilina u oxacilina, la cual es conferida por una proteína de unión a la penicilina, conocida como PBP2a y esta es codificada por el gen *mecA*. La proteína de unión a la penicilina de manera normal posee un dominio con función de transpeptidasa y otro dominio de unión a la penicilina. La función de transpeptidasa es indispensable en la síntesis de la pared celular ya que se encarga de la unión de las cadenas de N-acetilglucosamina y ácido-N-acetilmurámico que la integran; sin embargo, una vez que un antibiótico β -lactámico encuentra su blanco en el dominio de unión a la penicilina, esta proteína pierde su función de transpeptidasa por lo que la síntesis de la pared celular se interrumpe y entonces la célula bacteriana aumenta su presión osmótica y se lisa. En cambio, PBP2a tiene alterado el sitio de unión a los antibióticos β -lactámicos, por lo que estos fármacos no reconocen el blanco, y entonces la proteína continúa con su función normal de transpeptidasa, por lo tanto el microorganismo es resistente a los antibióticos β -lactámicos (Pinho *et al.* 2001a; Pinho *et al.* 2001b).

2.7.2 Estructura básica del SCC*mec*

Este casete es considerado un elemento móvil, puede medir entre 15 y 67 kb de longitud. De manera general presenta 4 características básicas (figura 1):

- Sus extremos se encuentran flanqueados por repeticiones directas e inversas que le permiten su integración en un sitio homólogo del cromosoma.
- En su extremo 3' posee un fragmento de lectura abierto llamado *orfX*
- Presenta un complejo de genes *mec* los cuales determinan la resistencia a meticilina.
- Presenta un complejo de genes *ccr* responsables de la movilidad de este elemento (Hanssen y Ericson Sollid 2006; Ito *et al.* 2007).

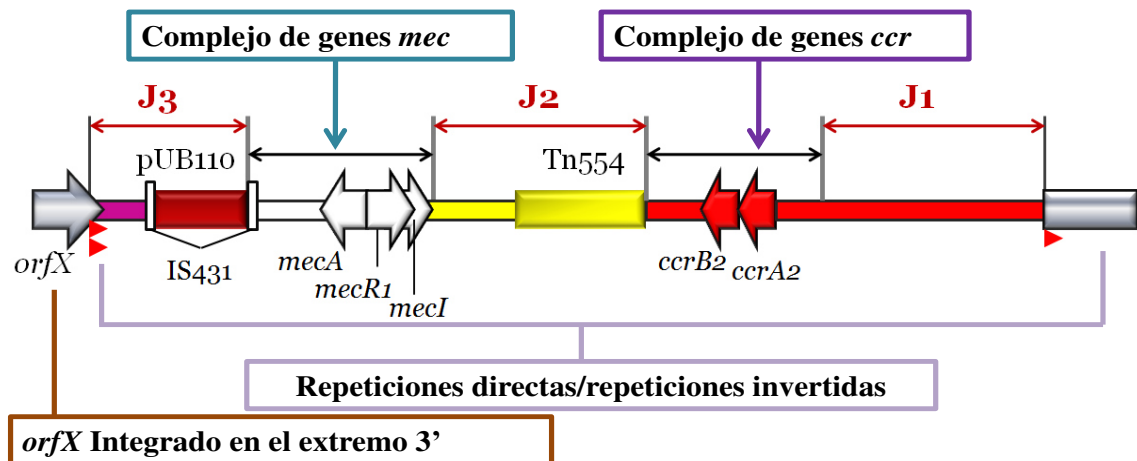


Figura 1. Características básicas de la estructura del SCC_{mec} (IWG-SCC 2008).

La presencia de este elemento genético móvil se ha demostrado en diversas especies bacterianas, sin embargo el enfoque principal de este casete se centró en *S. aureus* donde fue detectado y descrito por primera vez, así mismo se han identificado diferentes tipos de casete basados en la variedad de complejos de genes *mec* y *ccr* (Hanssen y Ericson Sollid 2006).

Hasta la fecha, se han descrito once diferentes tipos SCC_{mec} (I a XI) en *S. aureus* (tabla 2), en base a las modificaciones en la región reguladora *mecA* (complejo *mec*), el tipo de recombinasas cromosómicas que posee el casete (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* y *ccrC*), y en algunos los determinantes de resistencia dentro de las regiones de unión. La combinación de los complejos genéticos *mec* y *ccr* determinan el tipo de casete, sin embargo aunque dos casete diferentes presenten esta misma combinación, es decir que correspondan al mismo tipo, pueden presentar variabilidad, y esta se encuentra dada por las diferencias encontradas en las regiones de unión, anteriormente llamadas regiones de “depósito de basura” (IWG-SCC 2008).

Tabla 2. Tipos de SCC*mec* descritos para *S. aureus* y las combinaciones de *mec* y *ccr* para cada tipo.

Tipo de SCC <i>mec</i>	Tipo de <i>mec</i>	Tipo de <i>ccr</i>
I	B	1
II	A	2
III	A	3
IV	B	2
V	C2	5
VI	B	4
VII	C1	5
VIII	A	4
IX	C2	1
X	C1	7
XI	E	8

2.7.3 Complejo de genes *mec*

Existen 5 diferentes tipos de complejos de genes *mec* descritos para *S. aureus* clasificados como A, B, C, D y E (figura 2). Todos los complejos contienen *mecA*, genes reguladores el *mecI* y *mecRI*, además de secuencias de inserción 431. La expresión del gen *mecA* está regulada por dos proteínas, la codificada por el gen *mecI* la cual funciona como represora y la codificada por el gen *mecRI* funciona proteína inductora de la transcripción. Cuando *mecI* se une a la región promotora del gen *mecA*, la transcripción del gen *mecA* se reprime. Si se unen antibióticos β -lactámicos a *mecRI*, este gen libera un polipéptido que tiene actividad de proteasa capaz de degradar la proteína represora de *mecI*, como resultado se genera un aumento de la transcripción del gen *mecA*. En algunos complejos *mec*, los genes *mecI* y *mecRI* se suprimen o se truncan, esto es causado la mayoría de las veces por la integración de las secuencias de inserción (Hanssen y Ericson Sollid 2006; Ito *et al.* 2007). Por lo anterior, es importante señalar que aunque la transcripción del gen *mecA* se encuentra bien regulada, un estudio reciente reportó una cepa de *S. aureus* en la cual la resistencia a meticilina no se afectaba por la sobreexpresión del gen represor, debido a que éste presentaba una mutación que codificaba una proteína no funcional (Oliveira y de Lencastre 2011).

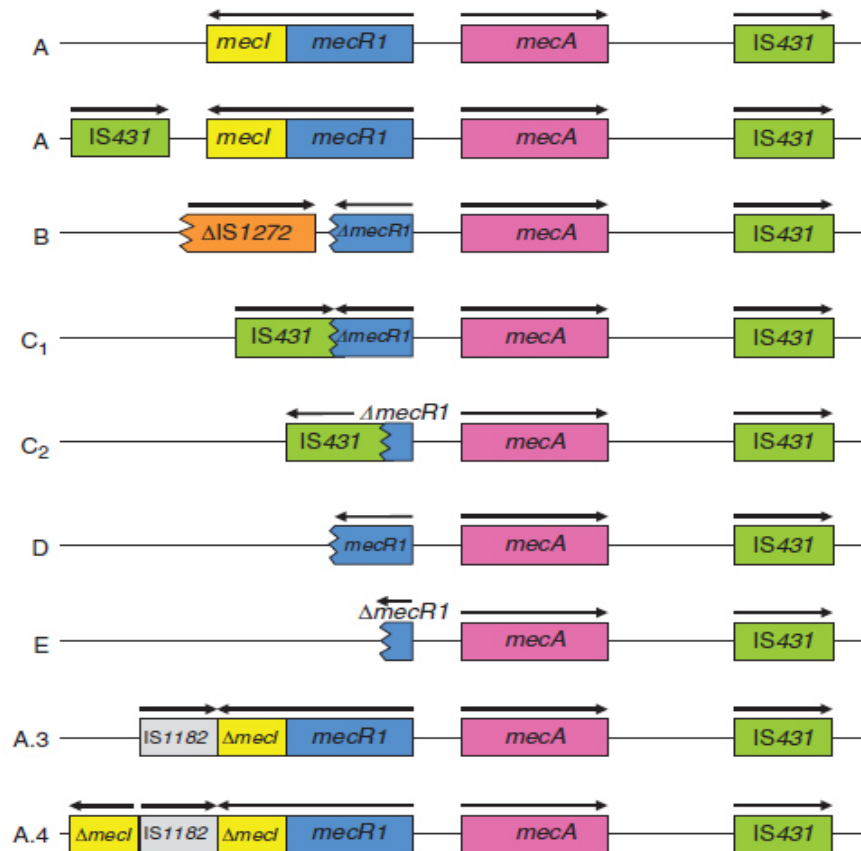


Figura 2. Clases de complejos *mec* descritos para *S. aureus*. *mecI* codifica un represor, *mecR1* codifica un inductor. Las flechas indican la dirección de la transcripción. (Hanssen y Ericson Sollid 2006).

Aunque los diversos tipos de complejos de genes *mec* son determinantes en la clasificación de este casete, existe una nomenclatura establecida para los casetes que no son portadores de este complejo de genes *mec*, pero que poseen otro tipo de genes que confieren virulencia o resistencia a ciertos compuestos, como por ejemplo el casete cromosómico estafilocócico *capI*, es nombrado así por ser portador de un complejo de genes capsulares, también dentro de este tipo de casetes se encuentra el casete cromosómico *fur* el cual es portador del gen de resistencia al ácido fusídico. El casete cromosómico estafilocócico Hg es portador del gen que confiere resistencia a mercurio, este tipo de casete ha sido identificado en *S. aureus* con un complejo de genes *ccr* diferente al resto de los casetes y mismo que se encuentra adjunto a un casete cromosómico estafilocócico portador de *mecA*. Y para los casetes que son portadores de un gen cuya función no ha sido descrita, la nomenclatura propuesta por el grupo internacional de

trabajo en los elementos del casete cromosómico estafilocócico indica que este debe nombrarse seguido del nombre de la cepa donde fue identificado (Chongtrakool *et al.* 2006; IWG-SCC 2008; 2009).

2.7.4 Complejo de genes *ccr*

El complejo de genes *ccr* es otro elemento que es determinante del tipo de casete. Se compone de uno o dos genes recombinasa sitio-específicos, y éstos son los responsables de la movilidad de los SCC*mec*. Estos genes catalizan la escisión y la integración precisa del lugar y la orientación específica de los elementos SCC*mec*.

Todas las proteínas codificadas por estos genes *ccr* tienen propiedades catalíticas en el dominio *N*-terminal. Actualmente existen cuatro alotipos para los genes *ccrA* y *ccrB* bien descritos y un solo alotipo de *ccrC* (figura 3).

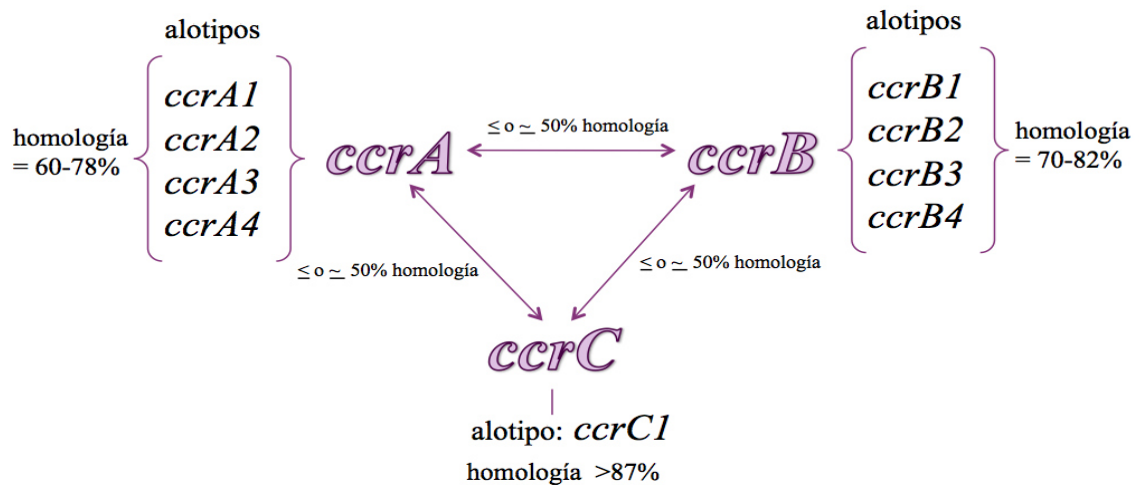


Figura 3. Representación de la homología entre los genes *ccr* y sus alotipos en *S. aureus*

El gen recombinasa *ccrC* se asocia a la resistencia al mercurio y además se ha encontrado en el casete tipo V de *S. aureus* (Ito *et al.* 2004). La combinación de estos alotipos determina el tipo de complejo recombinasa. Actualmente están descritos ocho tipos de complejos recombinasa que se han identificado en SCC*mec* de *S. aureus*, los

cuales se han designado con números arábigos (IWG-SCC 2008; 2009). Cabe señalar que el complejo de genes *ccr* se ha encontrado con una mayor diversidad que el complejo de genes *mec*, tanto en *S. aureus* como en los ECN (Hanssen y Sollid 2007; Urushibara *et al.* 2011). Por anterior, la identificación de este complejo presenta mayor dificultad; incluso, se han desarrollado algunas herramientas bioinformáticas para tipificar los genes recombinasa con mayor exactitud en base a su secuencia (Oliveira *et al.* 2008).

2.7.5 Regiones de unión (J)

En la estructura básica del casete cromosómico estafilocócico se han identificado 3 regiones de unión. La región de unión 1 se encuentra entre la región cromosómica derecha y el complejo de genes *ccr* esta región presenta diferencias fundamentales en para la identificación basadas en la presencia de algunos genes. La región de unión 2 se localiza entre la región de complejos de genes *ccr* y la de los genes *mec*, y sus diferencias se basan fundamentalmente en la presencia o ausencia de transposones o seudotransposones. La región de unión 2 se localiza entre la región de complejos de genes *mec* y el fragmento de lectura abierto y las diferencias en esta región se basan en la presencia o ausencia de plásmidos.

Existe una nomenclatura propuesta para designar las diferencias entre los subtipos determinados por las regiones de unión, y básicamente estas pueden nombrarse de 3 maneras distintas, dependiendo en que región se basen las diferencias o de los elementos que la componen. Por ejemplo si las diferencias se marcan en la región de unión 1 estas se designan el tipo de casete en números romanos seguido de letras minúsculas. En cambio si las diferencias son basadas en la presencia o ausencia de elementos genéticos móviles como los plásmidos o transposones el tipo de casete designado con números romanos se escribe seguido de una letra mayúscula, por ejemplo en el caso del tipo de casete IV y el casete IVA la diferencia es que este último es portador del gen plasmídico pUB110. La última propuesta de nomenclatura incluye las diferencias en cada una de las regiones de unión, en donde seguidos del tipo de casete, se representa con números arábigos el tipo de

región de unión 1, 2 y 3 respectivamente (Hanssen y Ericson Sollid 2006; IWG-SCC 2009).

2.7.6 Tipificación del casete

Para llevar a cabo la determinación del tipo de casete, se han desarrollado diferentes estrategias metodológicas, en las cuales de manera general consisten en identificar los tipos de complejos de genes recombinasa y complejos de genes *mec*, además de detectar la presencia de plásmidos y transposones que pueden encontrarse en las regiones de unión, y con ello establecer el tipo de casete con su subtipo correspondiente, esto se ha logrado mediante el diseño de una serie de PCR's múltiples con cebadores que amplifican cada región de interés (Milheirico *et al.* 2007; Turlej *et al.* 2011). Desde el año 2001 los investigadores Ito y Oliveira propusieron estrategias de este tipo, sin embargo cuanto más tipos de elementos fueron identificados en los casete se hicieron necesarios el uso nuevos cebadores para las regiones recién identificadas (Ito *et al.* 2001; Oliveira y de Lencastre 2002). Entonces en el año 2005 y 2007, Zhang y Kondo respectivamente sugirieron los que hasta el día de hoy constituyen los métodos más completos para la tipificación de casete (Zhang *et al.* 2005; Kondo *et al.* 2007).

2.8 SCC*mec* de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*

Aunque la mayoría de los trabajos de investigación sobre la distribución de los diferentes tipos de casete entre los ECN han sido exitosos, en estas tres especies no se ha logrado observar dicha distribución, ya que en estos estudios el casete cromosómico estafilocócico de estas especies es reportado como “no tipificable”, es decir cuando no presentan uno o los dos elementos básicos del casete, o con “nuevo casete”, cuando poseen una combinación diferente a la reportada en las especies de *S. aureus* (Garza-Gonzalez *et al.* 2010a; Zong y Lu 2010; Bouchami *et al.* 2011b; Zong *et al.* 2011). Este hecho sugiere que estas tres especies de ECN presentan diferentes tipos de complejos recombinasa y genes *mec*, por lo tanto puede presentar un tipo de casete distinto a los descritos para *S. aureus*.

2.9 Resistencia a los antibióticos y biopelícula

La resistencia a los antimicrobianos entre los *Staphylococcus* spp. se ha asociado principalmente a elementos genéticos (Hanssen y Ericson Sollid 2006). Sin embargo, existen reportes que sugieren un aumento en los niveles de resistencia a los antibióticos asociada a la formación de biopelícula (Davies 2003; de Allori *et al.* 2006; Frank *et al.* 2007).

Se ha reportado que las biopelículas formadas por aislamientos clínicos de ECN presentan un nivel extremadamente alto de tolerancia a múltiples antibióticos. La resistencia a los antibióticos en biopelícula de los ECN es probable que tenga múltiples causas que incluyen la insuficiencia de los antibióticos para llegar a las células de la biopelícula dentro del polímero extracelular, un microentorno desfavorable para la actividad antimicrobiana, el crecimiento bacteriano lento, la activación de respuestas de estrés dentro de la biopelícula o a la selección de las células resistentes por la exposición a los antibióticos en las biopelículas (de Allori *et al.* 2006; Frank *et al.* 2007; Qu *et al.* 2010).

Se han realizado diversos estudios para comparar la susceptibilidad a los antibióticos de las células de la biopelícula y planctónicas de bacterias Gram negativas, y se encontró que las células del biopelícula son 100-1000 veces más resistentes que las planctónicas (Bjarnsholt *et al.* 2007; Sommerfeld Ross *et al.* 2012; Gurung *et al.* 2013).

El tratamiento con antibióticos basado en los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* diseñados para las células planctónicas, en ocasiones no logra erradicar las infecciones por ECN productores de biopelícula, lo que pueden resultar en una infección crónica y la necesidad de la extirpación quirúrgica de las áreas afectadas (de Allori *et al.* 2006; Qu *et al.* 2010; Sommerfeld Ross *et al.* 2012). Por lo tanto, para este tipo de infecciones sería más apropiado basar el tratamiento en los perfiles de susceptibilidad de los ECN dentro de la biopelícula. La necesidad de crear terapias

eficaces para contrarrestar las infecciones asociadas a biopelícula representa un desafío que es necesario atender con urgencia.

El nivel de producción de biopelícula de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* aún no está definido, ya que en los pocos estudios realizados al respecto, los resultados han sido discrepantes (de Allori *et al.* 2006; Garza-González *et al.* 2011; Szczuka *et al.* 2015). La relación entre la producción de biopelícula y el posible incremento de la resistencia a los antibióticos en estas tres especies aún no ha sido reportado.

3. JUSTIFICACIÓN

Los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) son microorganismos aislados con frecuencia en infecciones nosocomiales, principalmente como agentes causales de bacteriemias.

Uno de los problemas para tratar las infecciones causadas por los ECN es la tasa alta de resistencia a los antibióticos. En este grupo de microorganismos la resistencia a meticilina y otros antibióticos está asociada a elementos genéticos, principalmente a la presencia del Casete Cromosómico Estafilocócico *mec*. Además, se ha descrito que el nivel de resistencia a los antimicrobianos es mayor en las células de biopelícula que en las planctónicas. Por lo tanto, el tratamiento con antibióticos basado en los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* diseñados para las células planctónicas, en ocasiones no logra erradicar las infecciones por ECN productores de biopelícula.

Tomando en cuenta que la formación de biopelícula es el principal factor de virulencia de los ECN y lo mencionado anteriormente, sería más apropiado basar el tratamiento antimicrobiano en los perfiles de susceptibilidad dentro de la biopelícula.

El cumplimiento de los objetivos y el análisis de los datos obtenidos en este estudio, permitirá contribuir con información nueva respecto a la utilidad de las pruebas estándares de susceptibilidad *in vitro* en los aislamientos de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri* productores de biopelícula.

4. HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri* presentan diferente perfil de susceptibilidad a los antibióticos, diferentes tipos de SCC*mec*, de niveles de producción de biopelícula y presentan menor susceptibilidad a varios antibióticos en las células de la biopelícula que en las planctónicas.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

Caracterizar molecularmente y evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y en biopelícula de aislamientos clínicos de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri*

Objetivos particulares

1. Identificar a nivel especie aislamientos clínicos de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*
2. Determinar la resistencia fenotípica y genotípica a meticilina.
3. Genotipificar el SCC*mec*.
4. Determinar la producción de biopelícula.
5. Determinar la presencia de genes asociados a la producción de biopelícula.
6. Determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas biopelícula.
7. Determinar la relación genética entre los aislamientos de la misma especie.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

En este estudio se incluyeron aislamientos clínicos de ECN. Los aislamientos se obtuvieron de la colección de cepas del Laboratorio de bacteriología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” y del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. Para el proceso de almacenaje de las cepas se asignó un número a cada aislamiento, se capturó el tipo de espécimen clínico del cual fue recuperado y no se capturó información de los pacientes. Por lo tanto, en este estudio se excluyeron los datos clínicos y solo se evaluaron los datos microbiológicos resultantes de los experimentos.

El procesamiento de las cepas se realizó de acuerdo a las metodologías establecidas para cumplir con cada objetivo. Durante el desarrollo experimental, manejo y procesamiento de las cepas se siguieron los lineamientos establecidos en las Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 referente a la protección ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo

Criterios de inclusión

- Aislamientos clínicos identificados como ECN
- Aislamientos almacenados en crioviales con caldo *Brucella* con glicerol
- Aislamientos almacenados a -70°C
- Aislamientos transportados en crioviales con agar soya

Criterios de exclusión

- Aislamientos que no fueron identificados como ECN
- Aislamientos rotulados inadecuadamente o con número ilegible
- Aislamientos de origen diferente a especímenes clínicos (veterinarios, superficies hospitalarias, fómites, alimentos, etc)
- Aislamientos en condiciones inadecuadas de almacenamiento (fuera del medio de cultivo indicado o almacenados por más de una semana a temperatura ambiente).

Criterios de eliminación

- Aislamientos identificados durante el estudio como especies diferentes a *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*
- Aislamientos cuya identificación bioquímica no presentó concordancia con la identificación molecular.
- Aislamientos que no se pudieron recuperar debido a la muerte del microorganismo o a la contaminación de la cepa por otro microorganismo.

6.2 Estrategia general

Los aislamientos se identificaron por sistema bioquímico a nivel de especie y se incluyeron en el estudio todos los presuntivos de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*. La identificación se confirmó por métodos moleculares. Posterior a la identificación, se realizó la detección de resistencia a meticilina por medio de un método fenotípico, así como la presencia del gen que codifica dicha resistencia (*mecA*) por PCR. En los aislamientos donde se detectó resistencia fenotípica y genotípica a meticilina se procedió a la tipificación del casete cromosómico estafilocócico *mec*. Después se evaluó la producción de biopelícula y los genes asociados a ésta. Posteriormente, los aislamientos productores de biopelícula se les determinó la susceptibilidad a los antibióticos de las células planctónicas y de biopelícula. Por último, se realizó la determinación de la relación genética entre los aislamientos de la misma especie para la detección de clonas y análisis de las mismas.

6.3 Aislamientos clínicos

Se colectaron 303 aislamientos clínicos, provenientes de sangre o líquido cefalorraquídeo, que cumplieron con los criterios propuestos por la CDC y por la NOM-045-SSA2-2004 como agentes causales de bacteriemia (Salud 2004; Hota *et al.* 2010). Estos fueron recolectados en el Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL desde el 2006 al 2014.

6.4 Identificación

Para la identificación se partió de la siembra de cada aislamiento en un medio no selectivo, y a partir de un cultivo en fase exponencial, se realizaron pruebas fenotípicas y extracción de material genético para la identificación molecular. La identificación definitiva se determinó tomando como parámetro la concordancia entre los resultados de la identificación fenotípica con la identificación molecular (Heikens *et al.* 2005).

6.4.1. Identificación fenotípica

Cada aislamiento fue sembrado en agar sangre e incubado durante 24 h a 37°C. A partir de los cultivos jóvenes se realizaron las pruebas primarias de identificación Gram, catalasa, coagulasa, oxidasa; y de acuerdo a los resultados de estas pruebas los aislamientos ECN se identificaron por pruebas bioquímicas a nivel especie por medio de la galería de asimilación de carbohidratos del sistema API® Staph (BioMérieux®, Inc., Durham, USA), para lo cual se llevó a cabo el procedimiento indicado por el fabricante.

6.4.1.1. Gram

Se colocó una gota de solución salina estéril sobre la superficie de un portaobjetos limpio y seco, con un asa bacteriológica se transfirió una colonia a la solución salina y este inóculo se homogenizó, extendió y se dejó secar a temperatura ambiente. La

preparación se fijó por calor y enseguida se cubrió con cristal violeta por un minuto y se enjuagó con agua, después se aplicó lugol, se dejó por un min y se enjuagó con agua, se decoloró con una mezcla de alcohol-acetona 70:30 por 5 s, se enjuagó con agua y se agregó safranina durante 1 min, se enjuagó con agua, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se observó al microscopio con los objetivos 40X y 100X.

6.4.1.2. Catalasa. Prueba en portabjetos

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre la superficie de un portaobjetos limpio y seco, con un asa bacteriológica se transfirió una pequeña cantidad del crecimiento de una colonia a la gota del peróxido de hidrógeno y se observó para comprobar el desarrollo de burbujas de oxígeno. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- Positivo → producción de una gran cantidad de burbujas
- Negativo → ausencia de burbujas o muy escasa cantidad.

6.4. 1. 3. Coagulasa. Prueba en tubo

Se colocaron 0.5 mL de plasma en tubo limpio, en el cual se transfirió una pequeña cantidad de colonia con un asa bacteriológica y se emulsificó, se incubó a 35°C durante 4 horas, posteriormente se observó si hubo formación de un coágulo inclinando suavemente el tubo, si en este momento no se observaron coágulos, se reincubó el tubo a temperatura ambiente y se tomó lectura 18 horas después. La interpretación de los resultados fue de la siguiente manera:

- Positivo → formación de coágulo (cualquier grado)
- Negativo → no hay formación de coágulo

6.4.1.4. Oxidasa. Método de Kovac

Se humedeció un papel filtro con 2-3 gotas de dihidroclorhidrato de tetra-metil-*p*-fenilendiamina al 1% y en este se colocó y extendió una colonia de no más de 24 horas,

empleando un palillo de madera, durante los siguientes 10 segundos se observó en busca de un cambio de color. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- Positivo → desarrollo de color violeta oscuro dentro de 10 segundos.
- Negativo → ausencia de color

6.4.1.5 API® Staph

- Preparación de la galería. Se llenó cada pocillo de la cámara con agua destilada (5 mL aproximadamente) para crear una atmósfera húmeda.
- Preparación del inóculo. Se realizó un precultivo en agar sangre el cual se incubó por un periodo entre 18-24 h a 37°C, posterior a esto se verificó la pureza del cultivo, con las colonias jóvenes se preparó una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 de McFarland, para ello se transfirieron de 3-5 colonias a la ampolla de API Staph Medium (extracto de levadura, bactopectona, oligoelementos, agua desmineralizada, pH 7.0-7.4).
- Inoculación de la galería. Con una pipeta se tomó la suspensión bacteriana y se rellenoó cada microtubo sin sobrepasar el nivel del tubo. Para las pruebas que se llevan a cabo bajo una atmósfera de anaerobiosis (arginina dihidrolasa y ureasa) se rellenaron los microtubos hasta el borde de la cúpula con aceite de parafina. Finalmente se cerró la cámara y se incubó durante 18-24 h a 37°C.
- Lectura e interpretación de resultados. Después de la incubación se agregó 1 gota de los reactivos indicados por el fabricante para las pruebas de reducción de nitratos a nitritos, fosfatasa alcalina y Voges-Proskauer, posterior a esto la galería abierta se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido este tiempo el resultado de cada prueba fue interpretado de manera visual de acuerdo al esquema provisto por el sistema API® Staph (Figura 4a y 4b), y estos fueron depositados en el software que se encuentra en la plataforma apiweb™:

<http://apiweb.biomerieux.com/>, en la cual aparece como resultado final la especie a la que corresponde cada aislamiento.

Durante todo el proceso de identificación bioquímica se empleó como control las cepas ATCC de *S. hominis* 27844, *S. cohnii* 29974 y *S. sciuri* 29060

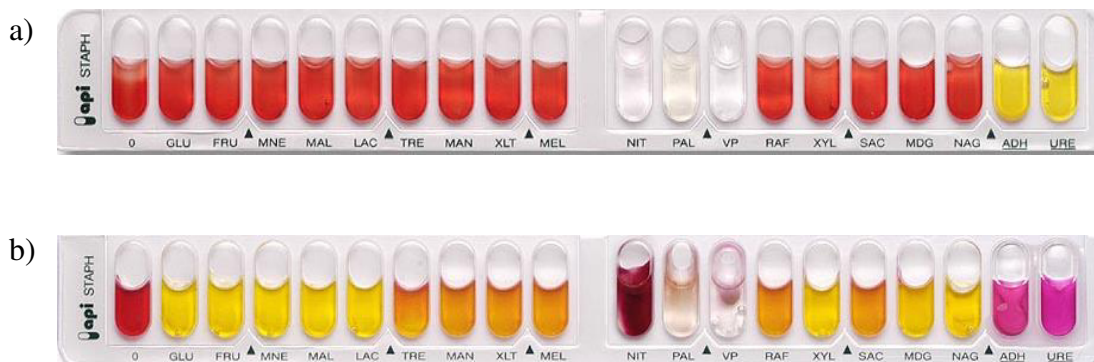


Figura 4. Esquema de colores para la interpretación de las pruebas. a) pruebas negativas, b) pruebas positivas.

6.4.2. Identificación molecular

Para confirmar la identidad de los aislamientos que resultaron como *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* mediante las pruebas bioquímicas, se realizó la amplificación, purificación y secuenciación de fragmento del gen 16S rRNA (Ghebremedhin *et al.* 2008).

6.4.2.1 Extracción de DNA genómico

A partir de un cultivo joven, se realizó una suspensión de una asada de colonias en 200 μ L de Tris-HCl 100 mM a la que se le añadieron 150 μ g de lisozima. Ésta suspensión se dejó en baño de agua a 37°C toda la noche (Baño de agua LAB-LINE®, Imperial IV). Posterior a la incubación se añadieron 200 μ L de TE 1X con SDS al 1% y 6 μ L de proteinasa K (10mg/mL) y se incubó a 55° por 2 h. Después se añadieron 250 μ L de fenol

saturado, 250 μL de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico) y 100 μL de TE 1X y se agitó por inversión durante 5 min. Enseguida la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min (Centrifuga, MicroliteRF). La fase acuosa se transfirió a otro tubo, y el paso de la extracción con fenol saturado, SEVAG y TE 1X se repitió. Una vez que se obtuvo por segunda vez la fase acuosa, se le añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto en donde se observó la formación de la hebra de DNA. Ésta se dejó precipitar a -20°C por 1 h. Posterior a la precipitación se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y el sedimento se lavó dos veces con 350 μL de etanol al 70%. El sedimento se dejó secar toda la noche, al siguiente día se resuspendió en 100 μL de TE 1X y se incubó a 65°C por 15 min. El DNA se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

6.4.2.2 Amplificación del gen 16S rRNA

Se realizó una PCR de punto final empleando el material genético obtenido por el método de lisis enzimática y con los iniciadores reportados previamente en 2004 por Pei y cols.(Martineau *et al.* 2001). Las secuencias de los iniciadores empleados son las siguientes: 16S rRNA-Forward 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' y 16S rRNA-Revers 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, E.U.A.); los cuales generan productos de PCR ≈ 1500 pb.

Para la mezcla de PCR añadieron: 10 ng de DNA, 1X buffer de reacción NH_4 pH 8.8, MgCl_2 1.5 mM, dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a una concentración de 15 pMol y 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 3 min a 95°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 1 min, elongación a 72°C por 1 min y por último 1 ciclo a 72°C por 1 min para la elongación final (Termocicladores: "PCR Sprint, Hybaid; PxE 0.2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation y MultiGene, Labnet).

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.5% empleando una cámara de

electroforesis Thermo Maxicell® Primo EC 340, el cual se sometió a 120 V por 45 min y se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/mL), se empleó un marcador de peso molecular de 200-10,037 pb (HyperLadder™ I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). Finalmente el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm empleando un fotodocumentador UVP Bioluming Systems. EpiChemi 3 Darkroom. Las imágenes fueron documentadas en formato digital mediante el software Labworks™.

Enseguida se verificó la presencia de los productos esperados mediante una electroforesis convencional.

6.4.2.3. Purificación del producto de PCR (16S rRNA)

Una vez que se confirmó la amplificación del producto esperado en la PCR del gen 16S rRNA éste se purificó por el método de precipitación con etanol. Para realizar la purificación, cada producto de PCR (50 µL) fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 5 µL de acetato de sodio 3 M pH 4.6 y 100 µL de etanol al 95%. La mezcla se homogenizó por agitación con vórtex y se mantuvo a -20°C durante 30-40 min. Se centrifugó por 20 min a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 300 µL de etanol al 70% y se agitó en vórtex. Se centrifugó en frío por 10 min a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche. Se resuspendió en 50 µL de agua estéril grado molecular.

6.4.2.4. Secuenciación y análisis de datos del gen 16S rRNA

Una vez que los productos fueron purificados, se enviaron al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron alineadas e identificadas mediante la Herramienta de Búsqueda y Alineamiento Local Básico (BLAST) disponible en la plataforma del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Fueron identificados como *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. scirui* los aislamientos cuya secuencia presentó un porcentaje de homología igual o mayor al 98% con esta especie dentro de la plataforma ya mencionada.

6.5. Resistencia a meticilina

La resistencia a meticilina se determinó por la prueba de difusión en disco con cefoxitina, la cual ha sido recomendada por el CLSI (CLSI 2012a). La lectura de los resultados fue de manera visual y la interpretación de éstos fue de acuerdo a lo estipulado en el documento M100-S2 del CLSI (CLSI 2012b). Posterior a esto, se realizó la determinación molecular de la resistencia a meticilina mediante detección del gen *mecA* por PCR de punto final.

6.5.1. Determinación con disco de cefoxitina

A partir de un cultivo joven en agar sangre se preparó un inóculo en solución salina por suspensión directa de las colonias, el cual se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL aproximadamente). Enseguida se inoculó la suspensión preparada en agar Müeller-Hinton, con un hisopo estéril se estrió de manera homogénea en toda la superficie de la placa, se dejó secar durante 3-5 minutos y con una pinza estéril se colocó el disco de cefoxitina al centro de la placa. Se incubó durante 24 h a 37°C y se midieron los halos de inhibición. Para el control de calidad se empleó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La interpretación fue de acuerdo a los siguientes criterios (CLSI 2015):

Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
Susceptible	Resistente
≥ 25	≤ 24

6.5.2. Determinación del gen *mecA*

Con el DNA previamente extraído por lisis enzimática, se realizó una PCR de punto final con los iniciadores reportados previamente en 2009 por Zhang *et al.* (Martineau *et al.* 2001). Las secuencias de los iniciadores empleados son las siguientes: MecA147-Forward 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-3' y MecA147-Reverse 5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3' (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, E.U.A.); los cuales generan productos de PCR ≈ 147 pb

Para la PCR se añadió 10 ng de DNA a una mezcla de reacción compuesta por 1X del buffer de reacción NH₄ pH 8.8, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.8 mM, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) e iniciadores a una concentración de 0.046 μ M.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 65°C por 45 s, elongación a 72°C por 1.5 min; y otros 25 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, 72°C por 1.5 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 10 min para la elongación final.

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.5% empleando una cámara de electroforesis Thermo Maxicell® Primo EC 340, el cual se sometió a 120 V por 45 min y se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/mL), se empleó un marcador de peso molecular de 200 a 10,037 pb (HyperLadder™ I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). Finalmente el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm empleando un fotodocumentador UVP BioImaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom. Las imágenes fueron documentadas en formato digital mediante el software Labworks™.

6.6. Tipificación del SCC_{mec}

La determinación del tipo de SCC_{mec} se realizó mediante la amplificación de los complejos de genes *mec* y genes *ccr* por PCRs múltiples tal como se describen en los métodos de Zhang y Kondo (Zhang *et al.* 2005; Kondo *et al.* 2007).

6.6.1. Método de Zhang

Se realizaron cuatro PCR's, tres múltiples y una convencional, la primera de ellas para determinar el tipo de casete, la segunda para la clase de *mec*, la tercera para el tipo de *ccr* y la última para clase de *ccrC*.

Para las cuatro PCR's los volúmenes de reacción se estandarizaron de la manera siguiente: se añadió 10 ng de DNA a una mezcla de reacción compuesta por 1X del buffer de reacción NH₄ pH 8.8, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.8 mM, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) y los iniciadores (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, E.U.A) se añadieron en diferentes concentraciones (Tabla 3).

Las tres primeras PCR's (tipo de casete, *mec* y *ccr*) se realizaron bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 65°C por 45 s, elongación a 72°C por 1.5 min; y otros 25 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, 72°C por 1.5 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 10 min para la elongación final.

Para la PCR convencional (determinación de *ccrC*) las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 45 s, elongación a 72°C por 45 s; y por último 1 ciclo a 72°C por 10 min para la elongación final.

6.6.2 Método de Kondo y cols.

Se realizaron seis PCR's múltiples: M-PCR 1 y M-PCR 2, para determinar el tipo de casete; M-PCR 3 y M-PCR 4, para asignar el subtipo de casete en base a los elementos contenidos en la región de unión 1; M-PCR 5 y M-PCR 6 para identificar plásmidos y transposones en la región de unión 3. La secuencia de los iniciadores (Alpha DNA, Montreal, Canadá) y región de amplificación se encuentran en la tabla 4.

Para M-PCR la mezcla de reacción se realizó con 10 ng de DNA, 1X del buffer de reacción NH_4 pH 8.8, MgCl_2 3.2 mM, dNTP's 0.8 mM, 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) y 0.1 μM de cada iniciador. De M-PCR 2 a M-PCR 5 la mezcla de reacción fue igual que para la M-PCR 1, excepto por la concentración de MgCl_2 que fue de 2 mM. Para la M-PCR 6 se empleó un kit de reacción que incluye *Taq* DNA polimerasa de alta eficiencia (Platinum®, Invitrogen, Foster City, CA, E.U.A), y la mezcla de reacción fue compuesta por 10 ng DNA, 1X de buffer de alta eficiencia (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 0.1 mM, DTT 1mM, glicerol al 50%), dNTP's 0.8 mM, MgSO_4 2 mM, cada iniciador a una concentración de 0.2 μM y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa de alta eficiencia.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: para M-PCR 1, 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 min, alineamiento a 57°C por 1 min, elongación a 72°C por 2 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 2 min para la elongación final. Para las M-PCR 2 a M-PCR 5 se emplearon las mismas condiciones de amplificación que en la M-PCR 1, excepto por la temperatura de alineamiento que fue de 60°C. Para la M-PCR 6, 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 s, alineamiento a 50°C por 30 s, elongación a 68°C por 8 min; y otros 20 ciclos a 94°C por 15 s, 50°C por 30 s, 68°C por 12 min; y por último 1 ciclo a 72°C por 7 min para la elongación final.

Tabla 3. Iniciadores empleados en la tipificación del SCCmec por el método de Zhang y cols.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	[μ M] ^a	(pb) ^b	Especificidad
Tipo I-F	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG	0.048	613	SCCmec I
Tipo I-R	GTTCTCTCATA GTATGACGTCC			
Tipo II-F	CGTTGAAGATGATGAA GCG	0.032	398	SCCmec II
Tipo II-R	CGAAATCAA TGGTTAATGGACC			
Tipo III-F	CCATATTGTGTA CGATGCG	0.04	280	SCCmec III
Tipo III-R	CCTTAGTTGTCGTAACA GATCG			
Tipo IVa-F	GCCTTATTCGAA GAAACCG	0.104	776	SCCmec IVa
Tipo IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCC			
Tipo IVb-F	TCTGGAATTACTTCA GCTGC	0.092	493	SCCmec IVb
Tipo IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC			
Tipo IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGA GAGC	0.078	200	SCCmec IVc
Tipo IVc-R	TTGGTATGA GGTATTGCTGG			
Tipo IVd-F5	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	0.28	881	SCCmec IVd
Tipo IVd-R6	TGCTCCA GTAATTGCTAAA G			
Tipo V-F	GAACATTGTTACTTAAATGA GCG	0.06	325	SCCmec V
Tipo V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACA CC			
MecA147-F	GTGAAGATATACCAA GTGATT	0.046	147	<i>mecA</i>
MecA147-R	ATGCGCTATA GATTGAAAGGAT			
mecI-F	CCCTTTTATACAATCTCGTT	0.08	146	<i>mec</i> clase A
mecI-R	ATATCATCTGCAGAATGGG			
IS1272-F	TATTTTGGGTTTCACTCGG	0.08	1,305	<i>mec</i> clase B
mecR1-R	CTCCACGTTAATTCCATTAATACC			
ccrAB- β 2	ATTGCCTTGATAATA GCCITCT	0.08		
ccrAB- α 2	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	0.08	700	<i>ccr</i> tipo 1
ccrAB- α 3	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	0.08	1,000	<i>ccr</i> tipo 2
ccrAB- α 4	AGCTCAAAAGCAAGCAATA GAAT	0.08	1,600	<i>ccr</i> tipo 3
ccrC-F	ATGAATTCAAAGAGCATGGC	0.08	336	<i>ccr</i> tipo 5
ccrC-R	GATTTAGAATTGICGTGATTGC			

^a Concentración del iniciador requerida para la reacción de amplificación

^b Tamaño del producto esperado

Tabla 4. Iniciadores empleados para la tipificación del SCC*mec* por el método de Kondo y cols.

Iniciador	Secuencia (5'- 3')	Genes o alelos	Producto (pb)
M-PCR 1			
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACA GG	<i>mecA</i> (mA1-mA2)	286
mA2	AACGTTGTAACCAACCCCAA GA		
1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1-ccrB</i> (1-βc)	695
2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2-ccrB</i> (2-βc)	937
3	AGCTCAAAAAGCAAGCAATA GAAT	<i>ccrA3-ccrB</i> (3-βc)	1,791
βc	ATTGCCTTGATAATA GCCITCT		
4.2	GTATCAATGCACCA GA ACTT	<i>ccrA4-ccrB4</i> (4.2-β4.2)	1,287
β4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT		
R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	<i>ccrC</i> (R- F)	518
F	CGTCTATTACAAGATGTAAAGGATAAT		
M-PCR 2			
ml6	CATAACTTCCCATTCTGCA GATG	<i>mecA-mecI</i> (mA7-ml6)	1,963
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	<i>mecA-IS1272</i>	2,827
IS2(iS-2)	TGAGGTTATTCA GATA TTTCGATGT	upstream de <i>mecA</i> (mA7-IS7)	804
mA7	ATATACCAAACCCGACA ACTACA	<i>mecA-IS431</i> upstream de <i>mecA</i> (mA7-IS2[iS-2])	
M-PCR 3			
1a3	TTTAGGAGGTAATCTCCTTGATG	E007 en tipo I.1SCC <i>mec</i> (1a3-1a4)	154
1a4	TTTTGCGTTTGCATCTCTACC		
4a1	TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT	CQ02 en tipo V.1(IVa) <i>SCCmec</i> (4a1-4a3)	458
4a3	AGAAAAGATAGAAGTTCGAAA GA		
4b3	AACCAACAGTGGTTACA GCTT	M001 en tipo IV.2(IVb) <i>SCCmec</i> (4b3-4b4)	726
4b4	CGGATTTTGA GACTCATCACCAT		
4c4	AGGAAATCGATGTCATTATAA	CR008 en tipo IV.3(IVc) <i>SCCmec</i> (4c4-4c5)	259
4c5	ATCCATTTCTCAGGA GTTAG		
4d3	AATTCACCCGTACCTGA GAA	CD002 en tipo IV.4(IVd) <i>SCCmec</i> (4d3-4d4)	1,242
4d4	AGAATGTGGTTATAA GATA GCTA		
M-PCR 4			
kdpB1	GATTACTTCAGAACCA GGT CAT	<i>kdpB</i> intypeII.1(IIa)S <i>CCmec</i> (kdpB1-kdpB2)	287
kdpB2	TAAACTGTGTCACA CGATCCAT		
2b3	GCTCTAAAAGTTGGATATGCG	SA01 en tipo II.2 (IIb) <i>SCCmec</i> (2b3-2b4)	1,518
2b4	TGGATTGAATCGACTA GAATCG		

4b3	AACCAACAGTGGTTA CA GCTT	II E03 en tipo I.3(II E) SCC <i>mec</i> or M001 en tipo IV.2(IVb) SCC <i>mec</i> (4b3-4b4)	726
4b4 II4-3	CGGATTTTA GACTCATCACCAT GTACCGCTGAATATTGATA GTGAT	RN06 en tipo II.4SCC <i>mec</i> (II4-3- II4-1)	2,003
II4-1 3a1	ACTCTAATCCTAATCACCGAAC ATGGCTTCA GCATCAATGAG	Z004 en tipo III.1SCC <i>mec</i> (3a1- 3a2)	503
3a2 5a1	ATATCCTTCAAGCGCGTTTC ACCTACAGCCATTGCATTATG	V024 en tipo VSCC <i>mec</i> (5a1-a2)	1,159
5a2	TGTATACATTTGCCCCACTAGCT		
M-PCR 5			
ermA1	TGAAACAATTTGTA ACTATTGA	<i>ermA</i> -CN030 o CZ021 en J2 región tipo II.1(IIa) o tipo III.1SCC <i>mec</i> (<i>ermA</i> 1-mN5)	2,756
cad4	ATTGCGATTCTTTCCGATATGG	<i>cadB</i> -CN030o CZ021 in J2 región tipo II.1(IIa) o tipo III.1SCC <i>mec</i> (<i>cad4</i> - mN5)	1,540
M-PCR 6			
ant1	CAGACCAATCAACATGGCACC	<i>mecA-ant</i> (4') en pUB110(mA1-ant1)	4,952
pT181-2	AGGTTTATTGTC ACTACAATTGA	<i>mecA</i> - <i>tetK</i> inpT181(mA1- pT181-2)	7,406
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACA GG		

6.7. Producción de biopelícula

Se realizó la determinación semicuantitativa de la formación de biopelícula mediante la tinción con cristal violeta partiendo de los protocolos descritos previamente (Christensen *et al.* 1985; Frank *et al.* 2007) Todos los aislamientos se ensayaron por cuadruplicado en dos experimentos diferentes llevados a cabo en diferentes días. Estos ensayos se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. En este ensayo se realizó la corrección del error de las tasas de crecimiento mediante la determinación del índice de biopelícula (IB).

Para la formación de biopelícula los aislamientos se sembraron en agar sangre o soya tripticaseína y se incubaron por 18-24 horas a 36° C. Se realizó la inoculación de cada aislamiento en 5 ml de caldo soya tripticasa y se incubaron por 18-24 horas a 36°C. Se preparó una dilución 1:100 de los cultivos caldo soya tripticasa suplementado con 1% de glucosa. Se colocaron 100 µl de cada cultivo diluido en cada una de las 4 celdas de la placa (3 para la determinación de biopelícula y 1 para la determinación de células planctónicas) y se incubó 24 h a 36°C. Posterior a la incubación se determinó la densidad óptica (DO) de las células planctónicas, para lo cual se transfirieron 100 µl de cultivo de una de las cuatro celdas de cada aislamiento a una nueva placa y la densidad óptica se midió a 600 nm.

Para determinar la densidad óptica de la biopelícula, se eliminaron las células planctónicas del resto de las celdas en la placa original. Se realizaron dos lavados, el primero con PBS pH 7.2 y el segundo con agua desionizada estéril y la placa se dejó secar al aire. Después se añadieron 125 µl de cristal violeta al 0.1% a cada celda y se dejó por 10 min a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo, se eliminó la solución de cristal violeta. Enseguida se realizaron cinco lavados con PBS 1X pH 7.4. Después se añadieron 200 µl de una mezcla etanol-acetona (70:30) y se dejó por 10-15 min a temperatura ambiente para que la biopelícula se disolviera. Finalmente la placa se llevó a un lector de placas de ELISA y se midió la densidad óptica a 570 nm. Para este ensayo se utilizaron las cepas control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus aureus* BAA-

44. El índice de biopelícula se obtuvo de la relación: DO de las células planctónicas entre DO de las células de biopelícula. Para simplificar el análisis de los datos se utilizó la clasificación ordinal para el nivel de biopelícula propuesta por Christensen y cols. $DO \leq 0.120$: no productor de biopelícula, > 0.120 a ≤ 0.240 : productor débil de biopelícula, > 0.240 : productor fuerte de biopelícula.

6.8. Genes asociados a la producción de biopelícula

Se realizó una PCR múltiple para determinar la presencia de los genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaR* e *icaD* utilizando el método previamente descrito (Arciola *et al.* 2005). La PCR se preparó añadiendo 10 ng DNA a una mezcla de reacción compuesta de 1X del buffer de reacción NH_4 pH 8.8, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP's 400 μ M, 0.5 U *Taq* DNA polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A) y los iniciadores (Instituto de Biotecnología UNAM, MO, México) se añadieron en diferentes concentraciones (Tabla 5). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 54°C por 30 s, elongación a 72°C por 1 min, y por último 1 ciclo a 72°C por 2 min para la elongación final.

Tabla 5. Iniciadores para la amplificación de los genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaR* e *icaD* y cols.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	[μ M] ^a	(pb) ^b	Especificidad
icaR-F	TAATCCCGAATTTTTGTGAA	1.6	469	<i>icaR</i>
icaR-R	AACGCAATAACCTTATTTTCC			
icaA-F	ACAGTCGCTACGAAAAGAAA	1.0	103	<i>icaA</i>
icaA-R	GGAAATGCCATAATGACAAC			
icaD-F	ATGGTCAAGCCCA GACAGAG	0.6	198	<i>icaD</i>
icaD-R	CGFGTTTTCAACATTTAATGCAA			
icaB-F	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	1.6	302	<i>icaB</i>
icaB-R	AAAGTCCCAT AAGCCTGTTT			
icaC-F	TAACTTTAGGCGCATATGTTTT	1.2	400	<i>icaC</i>
icaC-R	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG			

^a Concentración del iniciador requerida para la reacción de amplificación

^b Tamaño del producto esperado

6.9. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos

Para determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas se realizó el método de dilución en caldo descrito por el CLSI en el documento M07-A11 (CLSI 2015).

El perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula se realizó mediante la producción de biopelícula en el dispositivo Calgary para su posterior exposición a diversos antibióticos según lo descrito por Ceri *et al.*, 2001 (Ceri *et al.* 1999; Ceri *et al.* 2001). Para la interpretación de los resultados se utilizaron los lineamientos establecidos por el CLSI en el documento M100-S24 (CLSI 2015).

Los antibióticos y las concentraciones utilizadas se seleccionaron en base a lo establecido por el CLSI y fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich® (Toluca, Estado de México). El perfil de susceptibilidad en células planctónicas y de biopelícula, incluyeron la evaluación de los antibióticos eritromicina, trimetoprima, amikacina, vancomicina, linezolid, oxacilina, ciprofloxacina y cloranfenicol en concentraciones de 0.06 a 1,024 µg/mL.

6.9. 1. Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas

Como primer paso todos los aislamientos fueron sembrados en agar Müeller-Hinton y se incubaron por 24 h a 37°C. Por cada aislamiento se preparó una placa de 96 pocillos (12 x 8) con diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar. Las placas se llenaron utilizando una pipeta multicanal con 200 µL de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posteriormente se añadió un volumen de 100 µL de caldo Müeller-Hinton en todos los pocillos con excepción de los que tienen los antibióticos con la concentración más alta y las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 µL (2 a la 3, 3 a la 4, 4 a la 5 etc) de una celda a la otra y se eliminó 100 µL de la última celda de cada antibiótico, de tal manera que antes

del inóculo todas las celdas quedaran con un volumen total de 100 μL . Los dos últimos pocillos de la última fila se dejaron como controles negativos.

Posterior a la incubación de los cultivos, se prepararon los inóculos por suspensión de las colonias en 5 mL de solución salina que se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland, enseguida se realizó una dilución 1:10 en 15 mL de caldo Müeller-Hinton. El inóculo final fue de 5×10^5 UFC/mL y enseguida (15 minutos antes tras su preparación) se transfirieron con una pipeta multicanal 100 μL del inóculo a cada pocillo de la placa, con excepción de los controles negativos.

Las placas se incubaron a 37°C durante 16-20 horas. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se apilaron más de cuatro a cinco placas dentro de la incubadora. Después del periodo de incubación se procedió a realizar la lectura de los resultados. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhiba completamente el crecimiento del microorganismo en estudio. La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos usados como control positivo.

Los controles positivos presentan una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para la lectura se utilizó un lector con espejo en el que se reflejó la parte inferior de la placa de microtitulación. Para el control de calidad se empleó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

6.9. 2. Susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula

Para determinar la susceptibilidad a los antibióticos en células de biopelícula se siguió los ensayos previamente reportados (Ceri *et al.* 2001; Qu *et al.* 2010). La biopelícula bacteriana se desarrolló en las clavijas de poliestireno en el Dispositivo de Calgary tras la incubación del cultivo en una placa de microtitulación (MBEC™ -Physiology y Genética, Innovotech, Edmonton, AB, Canadá). Inicialmente, se preparó un inóculo bacteriano el cual se ajustó a una turbidez del 1.0 de la escala de McFarland y este fue diluido 1:50 (~

10⁸ CFU / mL) en caldo de soya tripticaseína con glucosa al 1%. Para establecer la biopelícula, se añadieron 100 µL del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. A continuación, se colocó la tapa y las clavijas de poliestireno quedaron sumergidas dentro de los inóculos. El dispositivo ensamblado se colocó en un agitador a 150 rpm en una incubadora humidificada durante 18-24 h a 35 ° C. Después de la incubación, las clavijas de la tapa se enjuagaron dos veces con 100 µL de PBS para eliminar las células no adherentes. La tapa se transfirió a una nueva placa de microtitulación con 100 µL de las diluciones seriadas de antibióticos (1,024 µg / mL a 0:06 µg / mL) en caldo de Mueller-Hinton (MHB) y MHB con 1% de NaCl (para oxacilina). Las placas de microtitulación se incubaron a 35°C durante 24 h. Después de la exposición a antibióticos, la tapa se retiró y las clavijas se lavaron dos veces con PBS. Una vez lavada, la tapa con las clavijas se transfirió a una nueva placa de microtitulación con MHB (placa de recuperación) la cual fue sonicada por durante 8 a 10 s a máxima intensidad en un ultrasonicador. (Branson 5800 limpiador ultrasónico). La placa de recuperación se incubó durante 24 horas a 35°C. Se comprobó visualmente la turbidez en los pocillos y la Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB) se definió como la concentración mínima de antimicrobiano que erradica la biopelícula.

La CMI y la CMEB se midieron en tres ocasiones diferentes. En el caso de no presentar concordancia entre los valores, se realizó un cuarto ensayo. Para el análisis de datos se consideró como una diferencia significativa, cuando los aislamientos mostraron un aumento de >2 veces la CMEB respecto de la CMI para amikacina, ciprofloxacino, eritromicina, linezolid, oxacilina y trimetoprima, y un aumento de > 3 veces para cloranfenicol. Esto fue establecido de acuerdo al rango aceptable de CMI para cada antibiótico en el control de calidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25913

6.10. Determinación de clonalidad: electroforesis en gel de campos pulsados

Para identificar y determinar la presencia de clonas, los aislamientos identificados definitivamente como *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* fueron sometidos a PFGE. Se tomó como referencia la metodología sugerida para *S. aureus* (Chung *et al.* 2000; Murchan *et*

al. 2003). Para los aislamientos de *S. hominis* se realizaron las modificaciones recomendadas para esta especie. (Bouchami *et al.* 2011b). El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

1^{er} día. Se sembraron los aislamientos en agar soya tripticaseína (TSA) en placa.

2^o día. A partir del cultivo anterior se inoculó una asada (una sola colonia) en 5 mL de caldo triptonsoya (TSB). Se incubaron hasta fase exponencial (16-18 h) a 37°C.

3^{er} día. Se fundió agarosa al 1.5% (Agarosa Certificada para Campos Pulsados, Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) con buffer TBE 0.5X en microondas y se mantuvo entre 40-42°C mediante calentamiento en baño de agua. Se prepararon 150 µL de agarosa por cada muestra. Se transfirió 2 mL de cultivo líquido a un tubo eppendorf y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. Se eliminó todo el sobrenadante sin remover la pastilla. Se añadió a la pastilla 1 mL de PIV frío, se agitó en vórtex hasta disolver y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm. Se preparó una mezcla de reacción para la lisis celular: lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá), lisostafina (Sigma-Aldrich Co., E.U.A.) y RNAsa (Epicentre, Inc., Madison, WI, E.U.A.) a concentraciones de 10 mg/mL.

Reactivo	Volumen necesario	Cantidad a añadir
Lisozima	10 µL/muestra	0.1 mg/muestra
Lisostafina	10 µL/muestra	0.1 mg/muestra
RNAsa	5 µL/muestra	10 µL/muestra

Posterior a eso se añadió la mezcla a añadió las 3 enzimas al buffer EC que cambia a EC-lisis y se dejó a temperatura ambiente (se preparó 1 mL de EC por muestra). Se eliminó el PIV de cada tubo. Se añadió 410 µL de PIV a cada muestra y se agitó en vórtex para disolver la pastilla. Se colocaron 150 µL de agarosa fundida a cada tubo, uno por uno, se agitó en vórtex, esto se realiza una muestra a la vez para evitar que solidifique la agarosa. Para preparar un disco de agarosa: se colocó 35 µL de la muestra con agarosa sobre un portaobjetos estéril forrado con papel parafilm (se preparó entre 5-7 discos por

muestra). Se dejó enfriar los discos a temperatura ambiente por 5 min y se transfirieron a un tubo de 15 mL. Se añadió 1 mL de EC-lisis al tubo y los discos se llevaron al fondo, sin agitar en exceso para evitar que se rompan. Se incubó por 3 h a 37°C. Se preparó una solución ESP (1 mL por muestra): se añadió 1 mg de proteinasa K a 1 mL de ES. El sobrenadante de EC-lisis se decantó con una gasa estéril, teniendo cuidado de no desechar los discos. Se añadió 1 mL de solución ESP y se incubó toda la noche a 37°C (mínimo 17h).

4° día. La solución se filtró con una gasa estéril, y se añadió 13 mL de TE 1X. Se agitó por inversión 1 h, y los pasos 18 y 19 se repitieron 5 veces, posterior a estos lavados los tubos con buffer TE 1X se almacenaron a 4°C hasta el siguiente día.

5° día. Se preparó el buffer para la restricción 10X (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) de la siguiente manera:

Reactivo	1 reacción
Buffer 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.15% Tritón X-100, 0.01% BSA, 50% Glicerol)	5 µL
Agua estéril grado molecular	35 µL

Se transfirieron con pinzas los discos a un tubo eppendorf de 2 mL y se añadieron 40µL de buffer de restricción (SIN ENZIMA) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para atemperar. Se preparó por separado la enzima *Sma* I, para los aislamientos *S. cohnii* y *S. sciuri*, y la enzima *Xho* I para los aislamientos de *S. hominis* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) de la siguiente manera:

Reactivo	1 reacción
Buffer 10X	5 µL
Agua estéril grado molecular	33 µL
Enzima <i>Sma</i> I/ <i>Xho</i> I (10 U/µL)	2 µL

Se colocaron los discos en las paredes del tubo eppendorf para poder sacar los 40 μ L del buffer de restricción sin enzima. Se añadieron los 40 μ L del buffer de restricción CON ENZIMA y se incubó toda la noche a 37°C.

6° día. Se desinfectó el equipo (CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad) con agua destilada estéril y una pequeña cantidad de cloro (10 mL aproximadamente) y se dejó por 20 min, se sacó el agua y se repitió el procedimiento pero sin cloro. Se sacaron los discos de la incubación, y se añadieron 4 μ L de buffer de carga 10X que contiene: 0.9% SDS, 50% glicerol, 0.05% azul de bromofenol (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). Se prepararon 7 L de TBE 0.5X. Se preparó el equipo, se verificó que no tuviera corriente y se apagó la bomba.

Se preparó el gel de agarosa al 1% con 150 mL de buffer, y se preparó un excedente de 10 mL.

1. Los 5 L de TBE 0.5X se añadieron a la cámara y se dejó hasta que el equipo alcanzara los 14°C
2. Se vació la agarosa a la placa, se colocó el peine, y los 10 mL excedentes de agarosa se dejaron en baño de agua a 50°C
3. Los discos de agarosa se colocaron en el gel, el marcador de PM al principio y al final, los pocillos se cubrieron con el gel con la agarosa que estaba a 50°C
4. El gel se colocó en el equipo y programaron las siguientes condiciones: primer bloque T inicial 2 s, T final 20 s, tiempo de corrida 11 h; segundo bloque T inicial 2 s, T final 7 s, tiempo de corrida 15 h; voltaje 6 V, ángulo 120.

7° día. Se retiró el gel del equipo y se tiñó con bromuro de etidio 1 μ g/mL por 5 min y se enjuagó con agua destilada, por último se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm (Fotodocumentador UVP Bioluming Systems. EpiChemi 3 Darkroom).

El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual tomando en cuenta los criterios establecidos para esta técnica (Tenover *et al.* 1995); y con ello se creó una base de datos la cual fue analizada por el programa estadístico SPSS® versión 20, utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard y

como resultado final se obtuvo un dendograma, con el objetivo de establecer los porcentajes de similitud entre los patrones de restricción de los aislamientos para poder determinar la presencia de clonas.

6.11. Análisis estadístico

Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con la corrección post-hoc Sidak para comparar las diferencias de las medias entre CMEB, CMI, y los valores de IB. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS.

7.1. Identificación

Los resultados de la identificación fenotípica indicaron que de los 273 aislamientos de ECN incluidos, el 37% ($n=102$) fueron *S. epidermidis*, el 25% ($n=67$) fueron *S. hominis*, el 16% ($n=44$) fueron *S. haemolyticus*, el 9% ($n=24$) fueron *S. cohnii*, 4% ($n=11$) fueron *S. sciuri*. Los otros 25 aislamientos pertenecieron a las especies de *S. capitis*, *S. xylosum*, *S. warneri*, *S. chromogenes* y *S. saprophyticus*.

La identificación molecular de las especies *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* se confirmó la identificación de casi la totalidad de los aislamientos. Un aislamiento de *S. cohnii* se descartó ya que presentó un porcentaje de identidad de 65%. Los aislamientos incluidos en el estudio se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Aislamientos incluidos en el estudio de acuerdo a la identificación definitiva.

Especie	Espécimen clínico
<i>S. hominis</i> $n= 67$	Sangre: $n=67$
<i>S. cohnii</i> $n= 23$	Sangre: $n=13$ Catéter: $n=7$ Hueso: $n=3$
<i>S. sciuri</i> $n=11$	Sangre: $n=6$ Catéter: $n=3$ Hueso: $n=1$ Ascitis: $n=1$

7.2. Resistencia a metilina

La frecuencia de aislamientos resistentes a metilina por la prueba de disco con cefoxitina fue de 100, 85 y 78% para las especies de *S. sciuri*, *S. hominis* y *S. cohnii*, respectivamente. Todos los aislamientos que fueron resistentes fenotípicamente a cefoxitina presentaron el gen *mecA*.

7.3. Tipificación del SCCmec

Los resultados de la tipificación del SCCmec para los aislamientos de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* se muestran en la tabla 7. De los aislamientos *mecA*-positivos de *S. hominis*, el 66.7% (38/57) tuvo un nuevo tipo de SCCmec. De estos aislamientos con nuevo tipo de casete todos presentaron un complejo *mecA* clase A. La combinación con *ccrABI* se encontró en 32 (56.1%) aislamientos, 4 (7%) aislamientos presentaron *ccrABI* + *ccrC*, 1 (1.8%) aislamiento presentó *ccrAB4* + *ccrC* y 1 (1.8%) aislamiento solo presentó *ccrC*. De los 14 (24.6%) aislamientos con SCCmec no tipificables, 10 (17.5%) solo amplificaron el complejo *mecA* clase A y otros 4 (7%) aislamientos no presentaron clase de *mec* ni de *ccr*.

Entre los 18 (78.3%) aislamientos de *S. cohnii* que presentaron el gen *mecA*, el 50% presentó un SCCmec nuevo, de los cuales todos tuvieron la clase A del complejo *mecA*. De estos, 5 (27.8%) aislamientos presentaron las recombinasas *ccrAB4* y *ccrC*, 2 (11.1%) aislamientos amplificaron para la *ccrABI* y 2 (11.1%) para la *ccrC*. Solamente 2 (11.1%) aislamientos presentaron un SCCmec no tipificable, uno de estos no amplificó ningún complejo recombinasa y el otro no presentó clase de *mecA*.

El total de los aislamientos de *S. sciuri* presentó el SCCmec. De los aislamientos que presentaron un casete no tipificable (72.7%), 6 (54.5%) presentaron el complejo *mecA* clase A y no amplificaron ninguna recombinasa y 2 (18.2%) aislamientos solamente presentaron tipo de recombinasa (*ccrAB4*, *ccrC*) pero no clase de *mecA*.

Tabla 7. Resultados de la tipificación del SCCmec de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*

Tipo SCCmec	<i>S. hominis</i> n=57 % (n)	<i>S. cohnii</i> n=18 % (n)	<i>S. sciuri</i> n=11 % (n)
NT	24.5 (14)	11.2 (2)	72.7 (8)
Nuevo	66.7 (38)	50 (9)	9.1 (1)
I	5.2 (3)	0 (0)	9.1 (1)
II	0 (0)	5.5 (1)	9.1 (1)
III	1.8 (1)	0 (0)	0 (0)
IV	0 (0)	5.5 (1)	0 (0)
VI	1.8 (1)	5.5 (1)	0 (0)
VIII	0 (0)	22.3 (4)	0 (0)

NT: no tipificable

7.4 Producción de biopelícula y genes *icaABDC*

Los aislamientos *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* incluidos en este estudio mostraron la capacidad para formar biopelícula sobre superficies de poliestireno. El 98.5% de los aislamientos de *S. hominis* mostraron producción de biopelícula, de los cuales el 91% mostró una producción fuerte y el 7.5% una producción débil de biopelícula. La media del índice de biopelícula (IB) fue de 0.181, 0.360 y 2.542 para los no productores, productores débiles y productores fuertes, respectivamente. El gen *icaD* se detectó en el 100% de los aislamientos productores de biopelícula y cuatro de esos aislamientos presentaron los otros cuatro genes del operon *icaABDC*.

El 74 % de los aislamientos *S. cohnii* fueron positivos para la producción de biopelícula, de los cuales el 22% se clasificaron como productores fuertes y el 52% como productores débiles de biopelícula. La falta de producción de biopelícula se observó en el 26% de los aislamientos. La media del índice de biopelícula (IB) fue de 0.239, 0.498 y 1.180 para los no productores, productores débiles y productores fuertes de biopelícula, respectivamente. El gen *icaD* se detectó en el 30% de los aislamientos productores de

biopelícula. El resto de los genes del operon *ica* no fue detectado en los aislamientos de *S. cohnii*.

S. sciuri mostró que el 54% de sus aislamientos tuvieron la capacidad de producir biopelícula. El 36% de estos aislamientos tuvo una producción fuerte y el 18% una producción débil de biopelícula. Los aislamientos que no mostraron producción de biopelícula representaron el 46%. La media del índice de biopelícula (IB) fue de 0.295, 0.529 y 2.981 para los no productores, productores débiles y productores fuertes, respectivamente. Todos los aislamientos de esta especie fueron negativos para los genes del operon *icaABDC*.

7.5. Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula

La frecuencia de resistencia a los antibióticos fue mayor en las células de biopelícula que en las células planctónicas para la mayoría de los antibióticos evaluados en *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*. (Figura 5). Particularmente los aislamientos de *S. hominis* mostraron un incremento en el número de aislamientos resistentes a los antibióticos en células de biopelícula, principalmente para eritromicina, amikacina, vancomicina y cloranfenicol donde la diferencia fue estadísticamente significativa. Para *S. hominis* los porcentajes de resistencia a eritromicina, trimetoprima, amikacina, vancomicina, linezolid, oxacilina, ciprofloxacino y cloranfenicol en células planctónicas fueron de 77.6, 79.1, 3, 0, 0, 85, 58.2 y 22.4% respectivamente, y para las células de biopelícula fueron de 88.1, 82.1, 9, 4.5, 6, 92.5, 62.7 y 44.8%, respectivamente.

El incremento de aislamientos de *S. cohnii* resistentes a los antibióticos en células de biopelícula se observó en eritromicina, trimetoprima y oxacilina. Un aislamiento de esta especie presentó resistencia a los antibióticos solamente en células de biopelícula. Para *S. cohnii* los porcentajes de resistencia a eritromicina, trimetoprima, amikacina, vancomicina, linezolid, oxacilina, ciprofloxacino y cloranfenicol en células planctónicas fueron de 62.2, 60.9, 0, 0, 0, 78.2, 69.5 y 17.4% respectivamente, y para las células de biopelícula fueron de 73.9, 69.6, 4.3, 0, 0, 86.9, 73.9 y 21.7%, respectivamente.

Entre los aislamientos de *S. sciuri*, la tasa de resistencia a los antibióticos fue mayor en células de biopelícula solamente para los antibióticos de trimetoprima y ciprofloxacino; sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa, ya que esta correspondió a solo un aislamiento. Para *S. sciuri* los porcentajes de resistencia a eritromicina, trimetoprima, amikacina, vancomicina, linezolid, oxacilina, ciprofloxacino y cloranfenicol en células planctónicas fueron de 72.7, 72.7, 0, 0, 0, 100, 54.5 y 36.3% respectivamente, y para las células de biopelícula fueron de 72.7, 81.8, 0, 0, 0, 100, 63.6 y 36.3%, respectivamente.

Entre los aislamientos de las tres especies no se detectó resistencia a linezolid y vancomicina en células planctónicas. En las células de biopelícula de *S. hominis* se detectó resistencia a vancomicina y linezolid en tres y cuatro aislamientos, respectivamente.

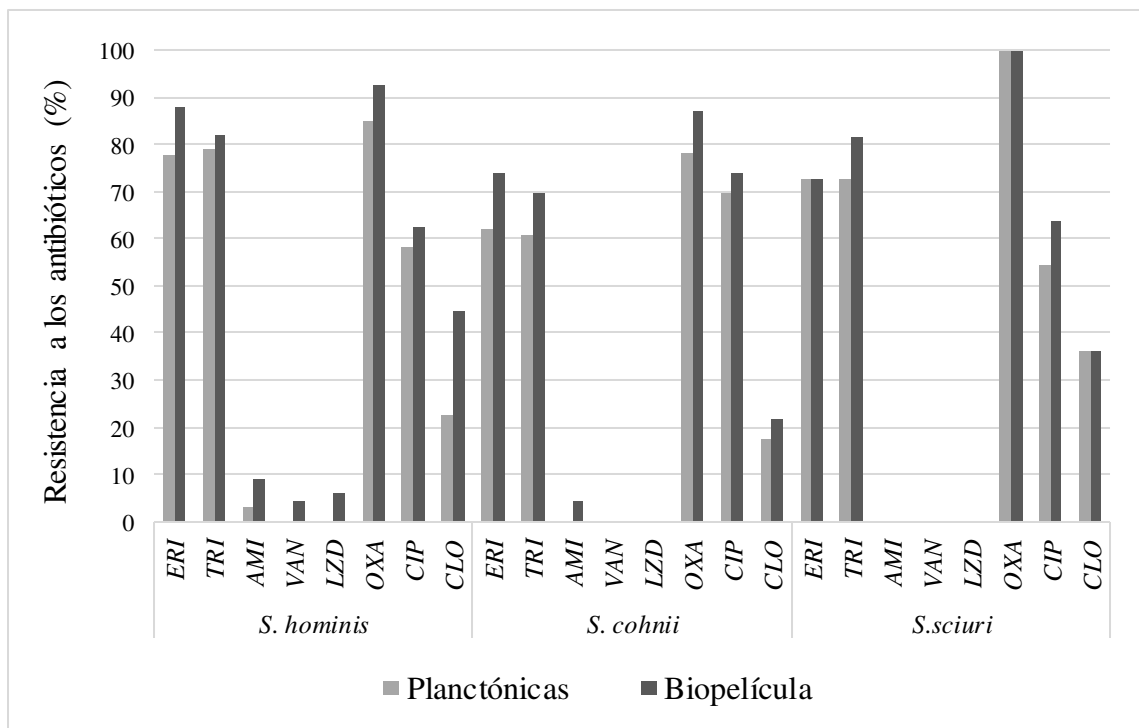


Figura 5. Frecuencia de aislamientos resistentes a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*. AMI: amikacina, VAN: vancomicina, CIP: ciprofloxacino, CLO: cloranfenicol, LZD: linezolid, TRI: trimetropim, ERI: eritromicina, OXA: oxacilina.

Las CMI₅₀, CMI₉₀, CMEB₅₀ y CMEB₉₀ para cada antibiótico evaluado en las tres especies se muestran en la tabla 8. No fue posible determinar las diluciones de diferencia entre los valores de CMI y CMEB de eritromicina debido a que la resistencia en células planctónicas superó la dilución máxima a la que éste antibiótico es soluble, por lo tanto para *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* las CMI y CMEB fueron mayores a 1,024 µg/mL. Cabe destacar que en las tres especies los valores de CMEB₉₀ para linezolid fueron significativamente mayores que los CMI₉₀. Mientras que para vancomicina esta misma diferencia en el incremento se obtuvo solamente en *S. hominis*.

Tabla 8. Resultados de la susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas y de biopelícula

Antibiótico ^a	Células ^b	µg/mL ^c					
		<i>S. hominis</i>		<i>S. cohnii</i>		<i>S. sciuri</i>	
		CMI ₅₀ CMEB ₅₀	CMI ₉₀ CMEB ₉₀	CMI ₅₀ CMEB ₅₀	CMI ₉₀ CMEB ₉₀	CMI ₅₀ CMEB ₅₀	CMI ₉₀ CMEB ₉₀
ERI	Planc	256	512	16	128	64	128
	Biop	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
OXA	Planc	2	256	2	4	1	16
	Biop	8	512	4	8	2	1024
LZD	Planc	1	1	1	4	0.5	1
	Biop	2	4	2	16	1	16
VAN	Planc	0.5	1	1	4	0.5	1
	Biop	2	4	2	8	1	1
CLO	Planc	8	64	4	16	4	32
	Biop	8	128	8	32	8	32
CIP	Planc	8	64	1	32	8	64
	Biop	32	128	8	32	8	64
AMI	Planc	1	2	4	16	2	32
	Biop	4	16	32	128	32	128
TRI	Planc	64	256	8	32	32	64
	Biop	512	> 1024	64	64	32	128

^aERI: eritromicina, OXA: oxacilina, LZD: linezolid, VAN: vancomicina, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacino, AMI: amikacina, TRI: trimetropim. ^bPlanc: planctónicas, Biop: biopelícula. ^cCMI₅₀ y CMI₉₀: Concentración mínima requerida para inhibir el desarrollo de las células planctónicas del 50 y 90% de los aislamientos, CMEB₅₀ y CMEB₉₀: Concentración mínima requerida para erradicar la biopelícula del 50 y 90% de los aislamientos. Las cifras con negritas indican diferencia significativa entre valores de CMI y CMEB.

Los resultados del análisis de la correlación del índice de biopelícula con la diferencia entre los valores de CMI y CMEB mostraron una significancia estadística solamente para la especie de *S. hominis*. Estos resultados se pueden observar en la figura 6. En general, la asociación de “a mayor índice de biopelícula, mayor diferencia entre CMEB y CMI” se pudo observar para todos los antibióticos evaluados en *S. hominis*.

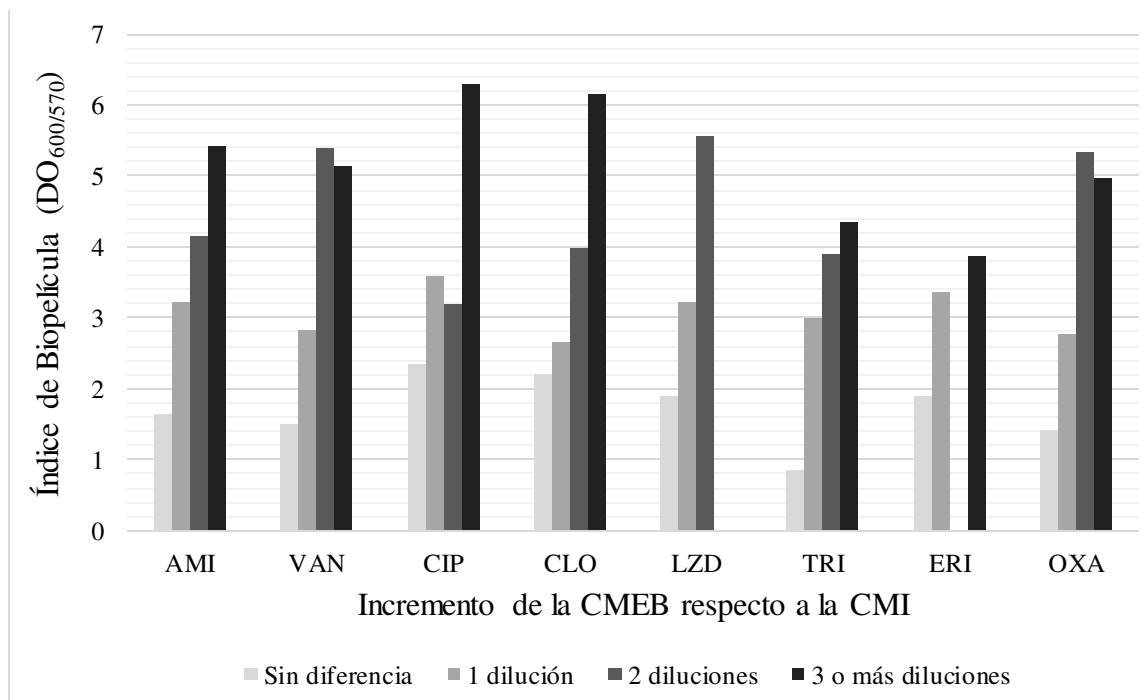


Figura 6. Asociación del índice de biopelícula con el incremento de la CMEB respecto a la CMI en *S. hominis*. AMI: amikacina, VAN: vancomicina, CIP: ciprofloxacino, CLO: cloranfenicol, LZD: linezolid, TRI: trimetopim, ERI: eritromicina, OXA: oxacilina.

7.7. Relación clonal

El perfil de clonalidad de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* reveló la presencia de al menos dos clonas en cada especie. El porcentaje de similitud entre los patrones de restricción de cada especie se representa en los dendogramas de la figura 7.

En *S. hominis* se observaron cuatro clonas, una de estas con cinco aislamientos, la cual fue designada como clona A, y otras tres clonas con dos aislamientos cada una, designadas como clonas B, C y D. Las cuatro clonas presentaron una fuerte producción de biopelícula. Los aislamientos de la clona A fueron recuperados en noviembre del 2013 de la unidad de cuidados intensivos pediátricos del Hospital Civil de Guadalajara. La clona A fue más resistente a amikacina, linezolid, eritromicina y trimetoprima en células de biopelícula que en las planctónicas; tres de los aislamientos de esta clona presentaron un tipo nuevo de SCC*mec* y un aislamiento tuvo casete no tipificable. La clona B incrementó la resistencia amikacina, eritromicina y oxacilina en células de biopelícula. Ambos aislamientos de esta clona presentaron un SCC*mec* no tipificable. Los aislamientos de la clona C presentaron mayor resistencia eritromicina y linezolid en células de biopelícula que en células planctónicas, además mostraron un tipo nuevo de SCC*mec*. La clona D tuvo incremento de la resistencia a amikacina, eritromicina y trimetoprima en células de biopelícula. Además, el SCC*mec* de esta clona fue clasificado como un tipo nuevo. Los dos aislamientos de las clonas B, C y D fueron aislados el mismo mes y de la misma área hospitalaria.

Entre los aislamientos de *S. cohnii* se observaron cuatro clonas designadas de la A a la D. La clona A incluyó ocho aislamientos, los cuales fueron recuperados a lo largo de tres años de diferentes áreas de cuidados intensivos (pediátricos, adultos y posquirúrgicos) del Hospital Universitario Dr. José E. González. Seis aislamientos de esta clona presentaron un tipo nuevo SCC*mec* y dos el tipo VIII. Tres aislamientos de esta clona no presentaron producción de biopelícula y cinco presentaron una producción débil. La resistencia a eritromicina y trimetoprima se incrementó con la producción de biopelícula en los aislamientos de la clona A. La clona B se conformó por tres aislamientos

recuperados en un lapso de seis meses de la misma área hospitalaria, de los cuales dos presentaron un tipo nuevo de SCC*mec* y uno no mostró elementos del casete. La producción de biopelícula fue débil para dos aislamientos de ésta clona y negativa para un aislamiento. La resistencia a eritromicina y amikacina fue mayor en las células de biopelícula. La clona C incluyó dos aislamientos que fueron recuperados con un tiempo de diferencia de un año, ambos aislamientos presentaron un SCC*mec* tipo VIII. Un aislamiento tuvo una producción fuerte de biopelícula y el otro una producción débil. La resistencia a amikacina, eritromicina y linezolid se incrementó en células de biopelícula para los aislamientos de ésta clona. La clona D se conformó por dos aislamientos, los cuales fueron recuperados el mismo mes de la misma área hospitalaria. Estos aislamientos no presentaron resistencia a meticilina ni elementos del SCC*mec*. Ambos aislamientos fueron negativos para la producción de biopelícula, por lo que el incremento de la resistencia en células de biopelícula no fue determinado.

La relación genética de *S. sciuri* reveló la presencia de dos clonas, designadas como A y B. La clona A incluyó tres aislamientos que fueron recuperados en un lapso de cuatro meses de la misma área hospitalaria. Dos aislamientos de ésta clona presentaron un SCC*mec* no tipificable, los cuales presentaron una producción fuerte de biopelícula y un aislamiento amplificó para el casete tipo II y no tuvo producción de biopelícula. La clona B se conformó por dos aislamientos que tuvieron un SCC*mec* no tipificable, uno de estos aislamientos mostró una producción de biopelícula fuerte y el otro una producción débil. Ambas clonas incrementaron la resistencia a eritromicina y trimetoprima en células de biopelícula.

En ninguna de las tres especies se encontró asociación entre el tipo de clona y la producción de biopelícula.

a)

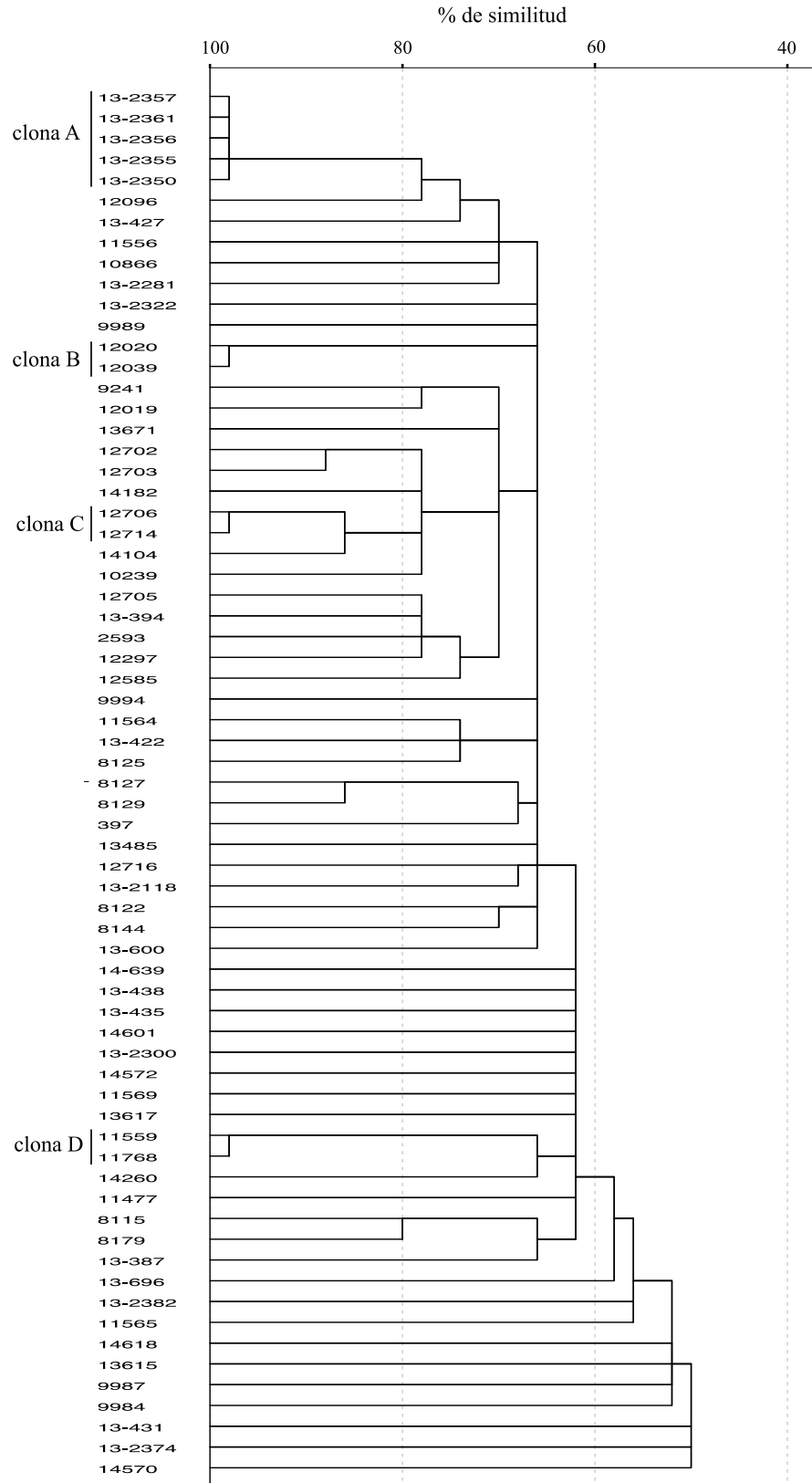


Figura 7. a) Dendrograma de la relación genética entre los aislamientos de *S. hominis*

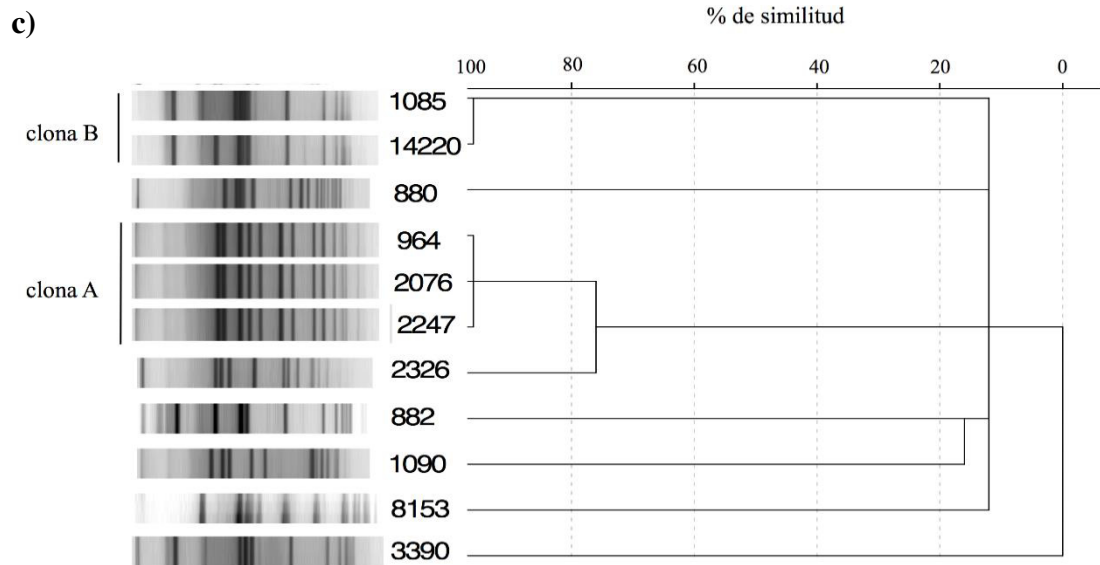
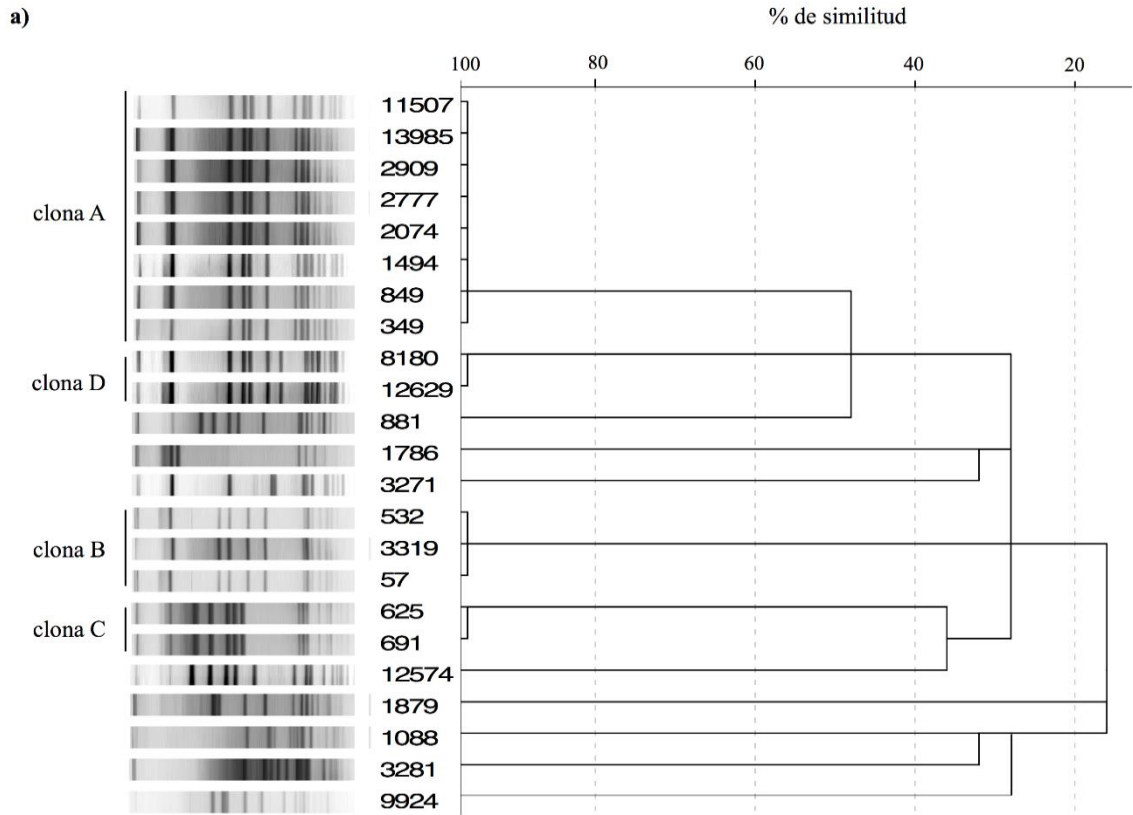


Figura 7. b) Dendrograma de la relación genética entre los aislamientos de *S. cohnii*. c) Dendrograma de la relación genética entre los aislamientos de *S. sciuri*

8. DISCUSIÓN

Conocer y comprender la patogenicidad y los factores de virulencia de los patógenos oportunistas *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* es relevante debido al incremento de estos microorganismos como agentes causales de infecciones asociadas a la atención de la salud, y a la menor disponibilidad de opciones terapéuticas para tratar estas infecciones debido a las elevadas tasas de resistencia a los antibióticos que presentan estas especies bacterianas. El grupo de los ECN son en conjunto los microorganismos aislados con mayor frecuencia en bacteriemias, principalmente las asociadas a uso de catéter central u otros dispositivos médicos. La bacteriemia es una infección del torrente sanguíneo que compromete la salud de manera grave, y las que son causadas por los ECN y *S. aureus* resistentes a meticilina tienen tasas de mortalidad alrededor del 30%, las cuales se pueden elevar tratándose se aislamientos resistentes a vancomicina o linezolid (Tak *et al.* 2013). La mayoría de los trabajos de investigación sobre los ECN se han enfocado en el estudio de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* y poco se conoce de las demás especies de este grupo.

Aunque las especies que integran el grupo de los ECN comparten características bioquímicas y morfológicas, los resultados algunos estudios han demostrado que existen diferencias entre los factores de virulencia, niveles de resistencia a los antibióticos y epidemiología molecular entre las especies y subespecies de este grupo de microorganismos.

Lo anterior aunado a los recientes reportes de diferentes especies de ECN resistentes a vancomicina y linezolid, los cuales son considerados como antibióticos de último recurso, demuestran la necesidad de una vigilancia epidemiológica constante de estas especies, del conocimiento respecto a los factores de virulencia y su repercusión en la elevada tasa de resistencia a los antibióticos. Es por eso que en este estudio se realizó la

caracterización molecular de la relación genética, genes asociados a la resistencia a meticilina y al factor de virulencia más importante de los ECN, la producción de biopelícula y su influencia en el perfil de susceptibilidad a los antibióticos.

La primera parte de este trabajo fue la identificación a nivel especie de un grupo de ECN y los resultados de la distribución de especies encontrada, coincide con lo reportado previamente, en donde *S. epidermidis* representa la especie más frecuente dentro de los ECN, y tanto *S. hominis* como *S. haemolyticus* se encuentran dentro de las tres especies aisladas con mayor frecuencia de sangre, espécimen de donde provienen la totalidad de los aislamientos de *S. hominis* incluidos en este estudio. *S. cohnii* y *S. sciuri* fueron especies encontradas con menor frecuencia, y aunque esta distribución coincide con las distribuciones reportadas en la literatura, el número de aislamientos de estas dos especies incluidos en este trabajo fue más alto que el de los incluidos en estudios previos de ECN (Al Wohoush *et al.* 2011; Ruiz de Gopegui *et al.* 2011).

Los especímenes clínicos de donde se aislaron *S. cohnii* y *S. sciuri* fueron más variados que los de *S. hominis*, ya que éstas especies no se aíslan con la misma frecuencia de sangre y son reportadas como agentes causales de un mayor espectro de infecciones. La concordancia entre los dos métodos de identificación utilizados en este trabajo fue alta. Esto es un resultado equiparable con lo reportado previamente en los trabajos de comparación de métodos de identificación de ECN, en donde se sugiere emplear además del sistema API Staph, el cual ha sido clasificado como uno de los de mayor especificidad, un método molecular que incluye la amplificación parcial de las secuencias 16S rRNA por ser una de las que permite una mayor discriminación entre las especies de este grupo (Heikens *et al.* 2005; Garza-Gonzalez *et al.* 2010c). Esta estrategia de identificación fue decidida tomando como base a lo reportado previamente por algunos autores, respecto a la mala identificación de los ECN a nivel especie con algunos sistemas bioquímicos (Layer *et al.* 2006; Mellmann *et al.* 2006; Brigante *et al.* 2008). De esta manera, se aumentó la exactitud del proceso de identificación y se aseguró un estudio que incluyera aislamientos exclusivamente de las especies de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*.

Los resultados de la determinación de resistencia a meticilina de las especies incluidas en este estudio mostraron una frecuencia alta de resistencia a meticilina y esta misma frecuencia tuvo concordancia con la presencia del gen *mecA*. La tasa de resistencia a meticilina para los ECN está reportada con un valor de alrededor del 80%, por lo que este valor coincide con los resultados obtenidos en este estudio, en donde las tasas de resistencia a meticilina en *S. sciuri*, *S. hominis* y *S. cohnii* fueron del 100, 85 y 78%, respectivamente. La frecuencia elevada de resistencia a meticilina encontrada en este trabajo, además de estar reportada previamente, fue un resultado esperado debido a que los que todos los aislamientos incluidos en este estudio fueron de procedencia clínica derivados de infecciones asociadas a la atención de la salud, en donde es frecuente la resistencia a los antibióticos de la clase β -lactámicos. Aunque la resistencia a los antibióticos β -lactámicos puede deberse a diferentes mecanismos como la hidrólisis enzimática por la producción de betalactamasas y/o el aumento en la permeabilidad por la disminución en la expresión de porinas, el principal mecanismo asociado a la resistencia a estos antibióticos es la producción de la proteína PBP2a, codificada por el gen *mecA*, y es por este mecanismo que todos los aislamientos incluidos en este estudio que fueron resistentes a meticilina, ya que todos presentaron el gen *mecA*.

La tipificación del casete por el método de Zhang y Kondo mostró resultados concordantes en la determinación de los elementos básicos del SCC*mec* (clase *mecA* y complejo de genes *ccr*). La mayoría de los aislamientos de las tres especies presentó una combinación de complejos *mec* y *ccr* distinta a la descrita para *S. aureus* (SCC*mec* nuevo) o elementos de estos complejos no detectados (SCC*mec* no tipificable). La distribución de los diferentes tipos de casetes ha sido bien determinada en *S. epidermidis* y en *S. hamolyticus*, donde los tipos de SCC*mec* III, IV y V se encuentran con frecuencia. Sin embargo, para *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* esta distribución no ha sido descrita, ya que la mayoría de los reportes sobre el SCC*mec* en estas especies lo muestran como un tipo nuevo como no tipificable. Estos datos coinciden con los resultados encontrados en este estudio. Otro dato encontrado en este estudio es que el 84.2% (32/38) de los SCC*mec* nuevos de *S. hominis* presentaron la combinación de *mecA* clase A y complejo *ccrABI*. Esta combinación ya había sido reportada previamente (Hanssen *et al.* 2004; Hanssen y

Sollid 2007; Bouchami *et al.* 2011b). Sin embargo, este es el estudio que reporta la mayor frecuencia de este nuevo SCC*mec*.

Un hallazgo interesante de la tipificación del SCC*mec* es que los casetes no tipificables de 17 aislamientos, no presentaron ningún tipo de complejo *ccr*. Esto podría deberse a varias razones: 1) las *ccr* presentes en los aislamientos no tipificables, no son reconocidas debido a que se encuentran distanciadas de *ccrAB* y *ccrC*, es decir, que se tratan de un tipo de *ccr* diferente y que no están relacionadas genéticamente con las ya descritas; 2) una frecuencia alta de mutación en la secuencia de unión de los iniciadores de *ccr* utilizados para *S. aureus*; 3) la recombinación homóloga entre los genes *ccr* que podrían generar nuevos isotipos que no son detectables por las PCR's establecidas para la tipificación; 4) que se trate de un casete en el cual los genes *ccr* fueron eliminados debido a que el gen *mecA* se transfirió de manera independiente (Hanssen y Ericson Sollid 2006). Contrario a lo anterior, se encontraron 8 aislamientos presentaron una combinación de dos más tipos de complejos recombinasa, lo cual puede indicar la existencia de un casete con dos tipos de complejos *ccr* o un SCC*mec* en tandem con un SCC no-*mec*. Estos resultados coinciden con lo reportado en algunos trabajos (Hanssen y Sollid 2007; Mombach *et al.* 2007; Ibrahem *et al.* 2009; Garza-Gonzalez *et al.* 2010a; Bouchami *et al.* 2011b; Garza-Gonz Lez *et al.* 2011).

Particularmente para *S. hominis* la proporción de aislamientos considerados como no tipificables o con nuevo casete, es mayor en este trabajo que en el reportado por Boucham y cols. en 2011, en donde el 32.4% de los aislamientos presentaron una estructura de SCC*mec* tipificable a diferencia de este estudio donde solamente el 8.8% presentó SCC*mec* con una estructura tipificable. Las razones de esta discrepancia podrían ser debidas a los diferentes especímenes clínicos incluidos en cada trabajo, a la patología del paciente o predilección geográfica; sin embargo para sustentar estos hechos serían necesarios más estudios sobre la epidemiología molecular de *S. hominis* en todo el mundo.

Tomando en cuenta la hipótesis de que transferencia del SCC*mec* fue de los ECN hacia *S. aureus*, este hecho sugiere que *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* son reservorios de

elementos básicos del SCC*mec* que se transfieren de manera independiente y que podrían haber sido los donantes de estos componentes para el ensamblaje de diferentes tipos de casetes

Los datos respecto a las nuevas estructuras, deben ser confirmados por secuenciación, y de esta manera se podrán establecer los nuevos tipos de SCC*mec* con la información completa de los elementos que contiene y de la proximidad entre sí. Además con esto se podría detectar la presencia de genes de resistencia que incluso no estén expresados y que en determinado momento pudieran transcribirse. Los resultados de este estudio, en conjunto con lo reportado en los trabajos donde se describen elementos de casete diferentes en las especies de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* (Pi *et al.* 2009; Zong y Lu 2010; Urushibara *et al.* 2011), contribuyen a demostrar que los ECN presentan una gran frecuencia y diversidad del SCC*mec*, y que además podrían contener elementos que aún no han sido encontrados en *S. aureus*.

En general, los resultados de la tipificación del SCC*mec* de los aislamientos incluidos en este trabajo ponen de manifiesto la inminente necesidad de estudiar cada especie de los ECN de manera individual y que puedan desarrollarse estrategias adecuadas para la tipificación del SCC*mec* de cada especie. Las metodologías utilizadas en este estudio solamente se basan en los datos de PCR para los dos elementos centrales del casete (complejo *ccr* y complejo *mec*), y aunque en *S. aureus* es un enfoque válido, para las especies de ECN la distribución y la estructura SCC*mec* sigue siendo difícil de alcanzar y se debe tener cuidado en la interpretación de los datos; es decir, que no podemos asegurar que algún elemento del casete no está presente solo por no observar su amplificación, ya se necesita asimilar que los iniciadores de estas metodologías fueron creados a partir de las secuencias de interés en *S. aureus*, y que una especie diferente por más emparentada genéticamente que ésta sea, puede existir una frecuencia alta de mutación en las regiones de unión con los iniciadores. Otra limitación de los métodos utilizados es que no tienen en consideración la proximidad de los dos elementos básicos en el cromosoma. A pesar que las posibles conclusiones planteadas en este estudio son factibles, no se puede afirmar que los elementos estructurales encontrados se localicen de igual manera que en el casete

descrito para *S. aureus*. Por lo tanto, si no se investiga cada especie de ECN por separado, el avance en el entendimiento del desarrollo de la resistencia antimicrobiana, así como sus mecanismos de acción, será muy difícil de lograr.

El nivel de producción de biopelícula fue diferente entre los aislamientos de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*, en donde los primeros mostraron la mayor frecuencia (98.5%) de aislamientos con capacidad de adherirse a superficies de poliestireno. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que reporta valores altos de producción de biopelícula en *S. hominis*, además la mayoría de aislamientos con un nivel fuerte de esta producción de acuerdo a la clasificación de Christensen *et al.* Sin embargo, en general la base molecular de la virulencia de las cepas de *S. hominis* en el contexto de la capacidad de formar biopelícula es casi desconocido. Hoy en día, las infecciones asociadas a la producción de biopelícula son de particular interés debido a que son muy difíciles de erradicar con el uso de esquemas estándar de antibióticos. En este estudio casi el 100% de los *S. hominis* clínicos tienen la capacidad de formar biopelícula *in vitro*, y es en este punto donde cabe señalar, que a diferencia de los aislamientos de *S. cohnii* y *S. sciuri* que presentaron una frecuencia más baja de formación de biopelícula, todos los aislamientos de *S. hominis* incluidos en este trabajo fueron aislados de hemocultivos, lo que pone de manifiesto que la producción de biopelícula puede tener un rol importante en el establecimiento de infecciones que pueden llegar al torrente sanguíneo. En algunos estudios previos respecto a la producción de biopelícula en *S. hominis* se encontró una elevada prevalencia del locus *icaADBC* el cual codifica el polisacárido intracelular de adhesión (PIA) que desempeña un papel crucial en la formación de biopelículas en la mayoría de las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* (Szczuka *et al.* 2015). En el 2006, se realizó el primer reporte de la presencia del operon *ica* en el genoma de *S. hominis* (Chokr *et al.* 2006). En ese trabajo, los investigadores encontraron que de las cuatro cepas de *S. hominis* estudiadas, dos fueron *ica*-positivos. Sin embargo, estas dos cepas con el gen *ica* no mostraron la capacidad de formar biopelícula *in vitro*. Los resultados obtenidos de un estudio en el año 2002 indicaron que cuatro cepas de *S. hominis* aisladas de neonatos tratados en una unidad de cuidados intensivos presentaron la capacidad de formar biopelícula (de Silva *et al.* 2002). En un estudio más reciente, reportaron que la mayoría

de los aislamientos clínicos de *S. hominis* presentaron el locus *icaADBC*, pero solamente la mitad de las cepas *ica*-positivos mostraron la capacidad de formar biopelícula (Szczyka *et al.* 2015). A diferencia de esos reportes, los resultados del presente estudio, mostraron una frecuencia alta de elementos del operon *icaADBC* de los cuales la mayoría (98.5%) mostró la capacidad de producir biopelícula *in vitro*. La discrepancia entre los resultados obtenidos en este estudio con los previamente reportados puede deberse a varios factores como el origen clínico de los aislamientos, la diferencia entre el número de aislamientos estudiados y a la probable diferencia en la composición y estructura de la biopelícula. Además, algunos trabajos han demostrado que la producción de biopelícula por cepas de *Staphylococcus* spp. *ica*-positivos es regulada también por otros genes y depende de condiciones ambientales y nutricionales tales como la concentración de glucosa, etanol, temperatura, osmolaridad y el crecimiento en condiciones anaeróbicas (Lim *et al.* 2004; Kim *et al.* 2008; Nuryastuti *et al.* 2008). Aunque en este estudio se encontró una frecuencia alta del gen *ica* y una fuerte producción de biopelícula, no podemos asumir que dicha producción sea dependiente del PIA, ya que para demostrar este hecho hacen falta estudios sobre la cuantificación de la expresión del locus *icaADBC* o del PIA.

En cuanto a la producción de biopelícula de *S. cohnii* y *S. sciuri* la información en la literatura es escasa. Sin embargo, los resultados de este estudio muestran una frecuencia alta de producción de biopelícula comparado con lo reportado previamente (de Allori *et al.* 2006). Los aislamientos de estas dos especies mostraron una baja frecuencia del locus *icaADBC*, por lo que probablemente la producción de biopelícula de estas dos especies no sea dependiente del PIA y este regulado por otros genes y factores ambientales. A la fecha no hay reportes sobre el estudio de la composición y estructura de la biopelícula en estas dos especies.

En un reporte sobre la producción de biopelícula de *S. hominis* se encontró que la estructura tridimensional de la biopelícula es característico para cada cepa (Szczyka *et al.* 2015). En ese estudio cinco cepas de *S. hominis* mostraron diferencias en el espesor de las estructuras de la biopelícula, y en los componentes de la matriz extracelular de la misma. En ese trabajo de investigación reportaron que algunas cepas de *S. hominis* tienen una

matriz extracelular de la biopelícula compuesta mayoritariamente por proteínas, mientras que en otras cepas el componente principal fueron los polisacáridos. Con los resultados de ese estudio previo y con los obtenidos en el presente trabajo una vez más se pone de manifiesto que las especies del grupo de ECN presentan diferencias importantes entre sus factores de virulencia y que la necesidad de conocer las bases moleculares de los mecanismos de patogenicidad incrementa con el número de reportes de estos patógenos oportunistas, particularmente con los reportes de aislamientos multifarmacorresistentes.

Los resultados del perfil de susceptibilidad a los antibióticos obtenido por los métodos estándares, es decir los realizados en células planctónicas, mostraron tasas superiores al 60% para la mayoría de los antibióticos evaluados en las tres especies incluidas en este estudio. La resistencia a múltiples fármacos entre los aislamientos *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* de este estudio coincide con los datos previamente reportados. Como se ha descrito, esta situación puede ser consecuencia de los períodos largos de internamiento y a la terapia antibiótica agresiva y continua a la cual son sometidos los pacientes hospitalizados. Esto puede convertir a estas especies en un depósito de genes de resistencia los cuales pueden ser donados a otras especies que comparten el mismo nicho ecológico, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus*, entre otros. Aunque entre estos aislamientos no se detectó resistencia en las células planctónicas a los denominados antimicrobianos de último recurso, como vancomicina o linezolid, los resultados de este trabajo contribuyen a evidenciar que nuestro país se encuentra inmerso en la problemática de la resistencia antimicrobiana (Amabile-Cuevas 2010). Otro factor importante a considerar respecto al desarrollo de la resistencia antimicrobiana a nivel mundial, es que el interés científico, haya enfocado sus prioridades sobre las bacterias patógenas, desestimando lo que podría ocurrir con las oportunistas, como *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*. Mientras tanto, esta porción “inofensiva” de la población bacteriana de los organismos animales y humanos sigue actuando como reservorio de elementos genéticos de resistencia a los antibióticos, de esta manera hoy en día estos microorganismos emergen como patógenos oportunistas de difícil tratamiento antimicrobiano (Prescott 2002).

Los aislamientos incluidos en este estudio presentaron diferencias en el perfil de susceptibilidad a los antibióticos entre las células planctónicas y las de biopelícula. En general, la mayoría de los aislamientos fueron más resistentes a los antibióticos en las células de biopelícula, principalmente en la especie *S. hominis* (Figura 5 y Tabla 8). El hecho de que *S. hominis* haya presentado una mayor resistencia en las células de biopelícula que las especies de *S. cohnii* y *S. sciuri* coincide con los resultados del nivel de producción de biopelícula de este estudio. Las células de biopelícula pueden ser más resistentes a los antibióticos probablemente porque se han reducido las tasas metabólicas y de crecimiento (en particular las células profundas dentro de la biopelícula), o porque la matriz de la biopelícula puede adsorber o reaccionar con los antibióticos, reduciendo así la cantidad de antibióticos disponibles para interactuar con las células en el biopelícula. Otra posibilidad es que la estructura de la biopelícula físicamente reduce la penetración de los agentes antimicrobianos impidiendo el acceso a las regiones basales de la biopelícula. Como resultado de estos factores, las células de la biopelícula pueden ser fisiológicamente distintas de las células planctónicas y, por tanto, expresar los factores de protección específicos (Hall-Stoodley *et al.* 2004; Hoiby *et al.* 2010; Sommerfeld Ross *et al.* 2012)

El tratamiento con antibióticos basado en los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* estándar diseñadas para las células planctónicas puede fallar para erradicar las infecciones causadas por especies de *S. cohnii*, *S. sciuri* y principalmente de *S. hominis*. Esta posibilidad es preocupante, particularmente cuando el tratamiento se basa en monoterapias con vancomicina o linezolid, a los que las células de biopelícula de *S. hominis* de este estudio mostraron un incremento significativo de la resistencia. Teniendo en cuenta estos datos, puede ser más útil basar los protocolos de tratamiento para las infecciones causadas por *S. hominis* en pruebas de sensibilidad a los antibióticos en células del biopelícula. Nuestros resultados coinciden con lo reportado previamente sobre otras especies de ECN (de Allori *et al.* 2006; Qu *et al.* 2010). Hasta donde conocemos este es el primer reporte sobre el incremento de la resistencia a los antibióticos en células de biopelícula de las especies de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*. Sin embargo, se debe tener

precaución antes de extrapolar estos resultados a todas las especies, debido a la alta variabilidad fenotípica y genética entre las especies y subespecies de ECN.

Los IB de *S. hominis* se asociaron con diferencias entre los valores de CMEB y CMI. Por ejemplo, con el aumento de los valores de IB, se incrementó la diferencias entre la CMEB respecto a la CMI (Figura 6). Este resultado sugiere que el nivel de producción de biopelícula puede ser proporcional al aumento de la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, esta posibilidad debe ser verificada con más ensayos que evalúan la estructura y la composición de la biopelícula.

En este estudio se detectaron clonas en las tres especies incluidas. En el caso de *S. hominis*, las cuatro clonas detectadas fueron productoras fuertes de biopelícula y la totalidad de los aislamiento de una clona fueron recuperados en una unidad de cuidados intensivos pediátricos. Este hallazgo coincide con varios reportes de brotes de infecciones del torrente sanguíneo entre los recién nacidos y adultos que se han atribuido a *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*. Por lo tanto las clonas de esta especie pueden propagarse en el medio hospitalario. Adicionalmente, se ha reportado que la colonización por *S. hominis* se detecta con frecuencia en las manos de enfermeras con lesiones de la piel. (Larson *et al.* 1998)

Aunque hubo presencia de clonas en *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri*, en general la relación genética de los aislamientos de cada especie mostró clonalidad baja (Figura 7a, b y c). Estos datos coinciden con lo reportado previamente sobre la epidemiología molecular estas tres especies (Bouchami *et al.* 2011b). Este resultado es contrario a lo que se esperaría partiendo de que el grupo de los ECN están clasificados como uno de los principales agentes de infecciones asociadas a la atención de la salud y a que los aislamientos provienen solamente de dos hospitales. Por otro lado, tomando en cuenta que estas tres especies forman parte de la microbiota normal de la piel y mucosas, los resultados obtenidos sugieren que la mayoría de las infecciones causadas en los pacientes podrían ser originadas de manera endógena y no por diseminación cruzada dentro del nosocomio.

Entre las clonas detectadas se presentaron diferencias entre los patrones de susceptibilidad a los antibióticos y los tipos de elementos del SCC*mec*. Cabe señalar que uno de los ejes principales de las líneas de investigación sobre el estudio de los ECN es la resistencia a los antibióticos, y es por esto que es necesario distinguir entre la propagación de las cepas resistentes (clonas) y la propagación de los genes de resistencia (transferencia horizontal). Por lo anterior, con los resultados obtenidos se puede deducir que los aislamientos incluidos en este estudio probablemente tienen genes de resistencia que no fueron adquiridos por propagación clonal y sí por transferencia horizontal. Resulta interesante ver que los aislamientos presentan diversidad genética alta, y de igual manera una diversidad alta en su fenotipo de resistencia a los antibióticos. Esto sugiere que la propagación de genes de resistencia está en incremento, y que su transferencia es independiente a la de otros genes, lo cual tiene sentido si los resultados obtenidos se contextualizan en el marco de la selección natural, en donde las bacterias con variantes capaces de resistir las concentraciones de antibióticos serán aptas para la supervivencia en el organismo donde se encuentren, y entonces el antibiótico se vuelve el primer factor de selección. Esto aunado a la producción fuerte de biopelícula que influye en el aumento de la resistencia a los antibióticos en *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* refleja un incremento en la dificultad para el tratamiento de las infecciones por estas especies.

9. CONCLUSIONES

- Los aislamientos de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* mostraron frecuencia alta de resistencia a metilina, con porcentajes del 85, 78 y 100 % respectivamente, asociadas con la presencia del SCC*mec*.
- Del total de los aislamientos que presentaron SCC*mec*, solo el 16.3 % fueron tipificables.
- El 66.7% y el 50% de los aislamientos de *S. hominis* y *S. cohnii* presentaron nuevas combinaciones de complejos *ccr* y *mec* sugiriendo nuevas estructuras de SCC*mec* para estas especies.
- La mayoría de los aislamientos (91%) de *S. hominis* fueron productores fuertes de biofilm.
- Ningún aislamiento de *S. hominis*, *S. cohnii* y *S. sciuri* presentó resistencia a linezolid y vancomicina en células planctónicas.
- Los aislamientos de *S. hominis* mostraron un incremento en las concentraciones mínimas inhibitorias para eritromicina, amikacina, trimetoprim, linezolid y oxacilina.
- El incremento en la resistencia a los antibióticos en *S. hominis* se asoció con mayores índices de biopelícula.
- La clonalidad en general fue baja, sin embargo se detectaron al menos dos clonas para las tres especies incluidas en este estudio.

10. PERSPECTIVAS

- Estudiar la estructura y composición de la biopelícula de estas tres especies
- Evaluar la asociación de la biopelícula con la presencia del locus *icaADBC*.
- Determinar los niveles de expresión de los genes *ica* y cuantificar la producción del PIA.
- Evaluar el perfil de susceptibilidad a otros antibióticos en células de biopelícula.
- Evaluar el efecto de antisépticos sobre el nivel de producción de biopelícula
- Determinar la capacidad de producción de biopelícula en modelos de diferentes dispositivos médicos

11. BIBLIOGRAFÍA

- Al Wohoush I, Rivera J, Cairo J, Hachem R and Raad I. 2011. Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 17(4): 569-571.
- Amabile-Cuevas C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries* 4(3): 126-131.
- Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L and Montanaro L. 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A* 75(2): 408-413.
- Archer GL and Niemeyer DM. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* 2(10): 343-347.
- Becker K, Heilmann C and Peters G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27(4): 870-926.
- Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Kristiansen S, Phipps R, Nielsen AK, Jensen PO, Hoiby N and Givskov M. 2007. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS* 115(8): 921-928.
- Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H and Miragaia M. 2011a. High prevalence of *mec* complex C and *ccrC* is independent of *SCCmec* type V in *Staphylococcus haemolyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H and Miragaia M. 2011b. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): low clonality and reservoirs of *SCCmec* structural elements. *PLoS One* 6(7): e21940.
- Brigante G, Menozzi MG, Pini B, Porta R, Somenzi P, Sciacca A, Spanu T and Stefani S. 2008. Identification of coagulase-negative Staphylococci by using the BD phoenix system in the low-inoculum mode. *J Clin Microbiol* 46(11): 3826-3828.
- Caierao J, Musskopf M, Superti S, Roesch E, Dias CG and d'Azevedo PA. 2004. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). *J Med Microbiol* 53(Pt 12): 1195-1199.
- Casey AL, Lambert PA and Elliott TS. 2007. Staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 29 Suppl 3: S23-32.
- Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A and Olson B. 2001. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods Enzymol* 337: 377-385.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D and Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37(6): 1771-1776.
- CLSI. 2015. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Five Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA, USA,.
- Couto I, de Lencastre H, Severina E, Kloos W, Webster JA, Hubner RJ, Sanches IS and Tomasz A. 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist* 2(4): 377-391.

- Couto I, Sanches IS, Sa-Leao R and de Lencastre H. 2000. Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 38(3): 1136-1143.
- Cunha BA, Esrick MD and Larusso M. 2007. *Staphylococcus hominis* native mitral valve bacterial endocarditis (SBE) in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Heart Lung* 36(5): 380-382.
- Chaves F, Garcia-Alvarez M, Sanz F, Alba C and Otero JR. 2005. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 43(9): 4877-4879.
- Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D and Jabbouri S. 2006. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J Med Microbiol* 296(6): 381-388.
- Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH and Hiramatsu K. 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 50(3): 1001-1012.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM and Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6): 996-1006.
- Chu VH, Cabell CH, Abrutyn E, Corey GR, Hoen B, Miro JM, Olaison L, Stryjewski ME, Pappas P, Anstrom KJ, Eykyn S, Habib G, Benito N, Fowler VG, Jr. and International Collaboration on Endocarditis Merged Database Study G. 2004. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis* 39(10): 1527-1530.
- Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sa-Leao R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P and Multilaboratory Project C. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 6(3): 189-198.
- d'Azevedo PA, Trancesi R, Sales T, Monteiro J, Gales AC and Pignatari AC. 2008. Outbreak of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* bloodstream infections in Sao Paulo city, Brazil. *J Med Microbiol* 57(Pt 2): 256-257.
- Davey ME and O'Toole G A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 847-867.
- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2(2): 114-122.
- de Allori MC, Jure MA, Romero C and de Castillo ME. 2006. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Biol Pharm Bull* 29(8): 1592-1596.
- de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP and Peacock SJ. 2002. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 40(2): 382-388.
- Djeribi R, Bouchloukh W, Jouenne T and Mena B. 2012. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am J Infect Control* 40(9): 854-859.
- Fitzgibbon JE, Nahvi MD, Dubin DT and John JF, Jr. 2001. A sequence variant of *Staphylococcus hominis* with a high prevalence of oxacillin and fluoroquinolone resistance. *Res Microbiol* 152(9): 805-810.
- Fleer A and Verhoef J. 1984. New aspects of staphylococcal infections: emergence of coagulase-negative staphylococci as pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 50(5-6): 729-744.

- Frank KL, Reichert EJ, Piper KE and Patel R. 2007. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 51(3): 888-895.
- Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Mart Nez VZMA, Gonzalez-Diaz E, Gonz Lez-Santiago O and Rodr Guez-Noriega E. 2011. Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus sciuri*. *Scand J Infect Dis* 43(11-12): 930-936.
- Garza-Gonzalez E, Lopez D, Pezina C, Muruet W, Bocanegra-Garcia V, Munoz I, Ramirez C and Llaca-Diaz JM. 2010a. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance. *J Med Microbiol* 59(Pt 3): 323-329.
- Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Llaca-Diaz JM and Rodriguez-Noriega E. 2010b. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol Infect* 138(5): 645-654.
- Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Macedo P, Gonzalez GM, Llaca-Diaz JM, Perez-Gomez R and Rodriguez-Noriega E. 2010c. Evaluation of Sensititre plates for identification of clinically relevant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 48(3): 963-965.
- Ghebremedhin B, Layer F, Konig W and Konig B. 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *J Clin Microbiol* 46(3): 1019-1025.
- Gilad J and Schwartz D. 2007. Identification of *Staphylococcus* species with the VITEK 2 system: the case of *Staphylococcus hominis*. *J Clin Microbiol* 45(2): 685; author reply 685-686.
- Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B and Bhattacharyya P. 2013. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med* 17(4): 214-218.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW and Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2(2): 95-108.
- Hanssen AM and Ericson Sollid JU. 2006. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46(1): 8-20.
- Hanssen AM, Kjeldsen G and Sollid JU. 2004. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 48(1): 285-296.
- Hanssen AM and Sollid JU. 2007. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 51(5): 1671-1677.
- Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A and Fluit AC. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 43(5): 2286-2290.
- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK, National Healthcare Safety Network T and Participating National Healthcare Safety Network F. 2008. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29(11): 996-1011.
- Hoiby N, Bjamsholt T, Givskov M, Molin S and Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35(4): 322-332.
- Hota B, Lin M, Doherty JA, Borlawsky T, Woeltje K, Stevenson K, Khan Y, Young J, Weinstein RA, Trick W and Program CDCPE. 2010. Formulation of a model for automating infection surveillance: algorithmic detection of central-line associated bloodstream infection. *J Am Med Inform Assoc* 17(1): 42-48.

- Huebner J and Goldmann DA. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* 50: 223-236.
- Ibrahem S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula AM, Lyytikäinen O, Jägerroos H, Broas M and Vuopio-Varkila J. 2009. Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility. *J Clin Microbiol* 47(1): 32-37.
- Ito T and Hiramatsu K. 1997. [Genetics of multiresistant MRSA]. *Nihon Rinsho* 55(5): 1200-1205.
- Ito T and Hiramatsu K. 1998. Acquisition of methicillin resistance and progression of multi-antibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Yonsei Med J* 39(6): 526-533.
- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C and Hiramatsu K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 45(5): 1323-1336.
- Ito T, Kuwahara K and Hiramatsu K. 2007. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol* 391: 87-102.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H and Hiramatsu K. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother* 48(7): 2637-2651.
- IWG-SCC. 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12): 4961-4967.
- Iyer MN, Wirosko WJ, Kim SH and Simons KB. 2005. Staphylococcus hominis endophthalmitis associated with a capsular hypopyon. *Am J Ophthalmol* 139(5): 930-932.
- Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T and Hiramatsu K. 2008. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strains disseminated among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol* 46(11): 3778-3783.
- Jiang S, Zheng B, Ding W, Lv L, Ji J, Zhang H, Xiao Y and Li L. 2012. Whole-genome sequence of Staphylococcus hominis, an opportunistic pathogen. *J Bacteriol* 194(17): 4761-4762.
- Katayama Y, Ito T and Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1549-1555.
- Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A and Yoon J. 2008. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1446-1453.
- Kloos WE. 1980. Natural populations of the genus Staphylococcus. *Annu Rev Microbiol* 34: 559-592.
- Kloos WE, George CG, Olgiate JS, Van Pelt L, McKinnon ML, Zimmer BL, Muller E, Weinstein MP and Mirrett S. 1998. Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3: 799-812.
- Kloos WE and Schleifer KH. 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus simulans. *Int J Syst Bacteriol* 25(1): 62-79.
- Kloos WE, Schleifer, Karl H., Smith, Rodney F. 1976. Characterization of Staphylococcus sciuri sp. nov. and Its Subspecies *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26: 22-37.
- Koksal F, Yasar H and Samasti M. 2009. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res* 164(4): 404-410.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J and Hiramatsu K. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 264-274.

- Larson EL, Hughes CA, Pyrek JD, Sparks SM, Cagatay EU and Bartkus JM. 1998. Changes in bacterial flora associated with skin damage on hands of health care personnel. *Am J Infect Control* 26(5): 513-521.
- Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, Konig W and Konig B. 2006. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 44(8): 2824-2830.
- Lim Y, Jana M, Luong TT and Lee CY. 2004. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186(3): 722-729.
- Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK, Emerging Infections Program Healthcare-Associated I and Antimicrobial Use Prevalence Survey T. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 370(13): 1198-1208.
- Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M and Bergeron MG. 2001. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* 39(7): 2541-2547.
- Mellmann A, Becker K, von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P and Harmsen D. 2006. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis* 12(2): 333-336.
- Milheirico C, Oliveira DC and de Lencastre H. 2007. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *J Antimicrob Chemother* 60(1): 42-48.
- Mombach AB, Reiter KC, Paiva RM and Barth AL. 2007. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microbiol* 56(Pt 10): 1328-1333.
- Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP, Lemmon MM, Lescoe M, Jiang Y, Rolston KV and LaSala PR. 2010. Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother* 65(9): 2001-2004.
- Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G and Cookson B. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 41(4): 1574-1585.
- Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, Kuijper R, Aman AT and Krom BP. 2008. recA mediated spontaneous deletions of the icaADBC operon of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates: a new mechanism of phenotypic variations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(2): 317-328.
- Oliveira DC and de Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(7): 2155-2161.
- Oliveira DC and de Lencastre H. 2011. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the mecA gene repressor: a surprising observation. *PLoS One* 6(8): e23287.
- Oliveira DC, Santos M, Milheirico C, Carrico JA, Vinga S, Oliveira AL and de Lencastre H. 2008. CcrB typing tool: an online resource for staphylococci ccrB sequence typing. *J Antimicrob Chemother* 61(4): 959-960.
- Osman KM, Abd El-Razik KA, Marie HS and Arafa A. 2015. Relevance of biofilm formation and virulence of different species of coagulase-negative staphylococci to public health. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Palazzo IC, d'Azevedo PA, Secchi C, Pignatari AC and Darini AL. 2008. *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 62(6): 1222-1226.

- Petinaki E, Spiliopoulou I, Maniati M and Maniatis AN. 2005. Emergence of *Staphylococcus hominis* strains expressing low-level resistance to quinupristin/dalfopristin in Greece. *J Antimicrob Chemother* 55(5): 811-812.
- Pi B, Yu M, Chen Y, Yu Y and Li L. 2009. Distribution of the ACME-arcA gene among methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and identification of a novel ccr allotype in ACME-arcA-positive isolates. *J Med Microbiol* 58(Pt 6): 731-736.
- Pinho MG, de Lencastre H and Tomasz A. 2001a. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10886-10891.
- Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H and Tomasz A. 2001b. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183(22): 6525-6531.
- Prescott LM. 2002. Highlights of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). *Body Posit* 15(3): 6-9.
- Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM and Deighton MA. 2010. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 9: 16.
- Rogers KL, Fey PD and Rupp ME. 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 23(1): 73-98.
- Ruiz de Gopegui E, Iuliana Marinescu C, Diaz P, Socias A, Garau M, Ayestaran JI, Pareja A, Gallegos MC, Perez JL and Oliver A. 2011. [Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29(5): 339-344.
- Ruppe E, Barbier F, Mesli Y, Maiga A, Cojocar R, Benkhalfat M, Benchouk S, Hassaine H, Maiga I, Diallo A, Koumare AK, Ouattara K, Soumare S, Dufourcq JB, Nareth C, Sarthou JL, Andremont A and Ruimy R. 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2): 442-449.
- Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Vaara M and Saxén H. 2008. Nosocomial bloodstream infections in children: an 8-year experience at a tertiary-care hospital in Finland. *Clin Microbiol Infect* 14(11): 1072-1075.
- Schleifer KHaK, Wesley E. 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Systematic Bacteriology* 25(1): 50-61.
- Soderquist B and Berglund C. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Clin Microbiol Infect* 15(12): 1176-1178.
- Sommerfeld Ross S, Reinhardt JM and Fiegel J. 2012. Enhanced analysis of bacteria susceptibility in connected biofilms. *J Microbiol Methods* 90(1): 9-14.
- Sorlozano A, Gutierrez J, Martinez T, Yuste ME, Perez-Lopez JA, Vindel A, Guillen J and Boquete T. 2010. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(1): 73-80.
- Stewart PS and Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276): 135-138.
- Szczuka E, Telega K and Kaznowski A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)* 60(1): 1-5.

- Szczuka E, Trawczynski K and Kaznowski A. 2014. Clonal analysis of *Staphylococcus hominis* strains isolated from hospitalized patients. *Pol J Microbiol* 63(3): 349-354.
- Tak V, Mathur P, Lalwani S and Misra MC. 2013. Staphylococcal blood stream infections: epidemiology, resistance pattern and outcome at a level 1 Indian trauma care center. *J Lab Physicians* 5(1): 46-50.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9): 2233-2239.
- Tre-Hardy M, Vanderbist F, Traore H and Devleeschouwer MJ. 2008. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *Int J Antimicrob Agents* 31(4): 329-336.
- Turlej A, Hryniewicz W and Empel J. 2011. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 60(2): 95-103.
- Urushibara N, Paul SK, Hossain MA, Kawaguchiya M and Kobayashi N. 2011. Analysis of Staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus sciuri*: identification of a novel ccr gene complex with a newly identified ccrA allotype (ccrA7). *Microb Drug Resist* 17(2): 291-297.
- Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H and Tomasz A. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of mecA from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist* 2(4): 435-441.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T and Conly JM. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43(10): 5026-5033.
- Zhang L, Thomas JC, Miragaia M, Bouchami O, Chaves F, d'Azevedo PA, Aanensen DM, de Lencastre H, Gray BM and Robinson DA. 2013. Multilocus sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, *Staphylococcus hominis*. *PLoS One* 8(6): e66496.
- Zong Z and Lu X. 2010. Characterization of a new SCCmec element in *Staphylococcus cohnii*. *PLoS One* 5(11): e14016.
- Zong Z, Peng C and Lu X. 2011. Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS One* 6(5): e20191.

Uncategorized References

- CLSI (2012a). M02-A11. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition.
- CLSI (2012b). M100-S22. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement.
- IWG-SCC. (2008). "SCCmec Background." from <http://www.sccmec.org/>, <http://www.staphylococcus.net/>.
- Salud Sd (2004). Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-045-SSA2-2004, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. México, Diario Oficial de la Federación.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Soraya Sarahí Mendoza Olazarán

Candidata para el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Tesis: **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus sciuri***

Campo de estudio: Microbiología médica y epidemiología molecular.

Datos Personales: Nacida en Cd. Victoria, Tamaulipas el 31 de Agosto de 1986.

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2009 con el grado de Químico Clínico Biólogo y en el año 2012 con el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica.

Experiencia profesional: Profesor y asistente de investigación en la Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

APÉNDICES

A. Datos y resultados de los aislamientos

N° aislamiento	Identificación	Fecha de colección	Hospital ^a	Sala ^b	Espécimen
57	<i>S. cohnii</i>	04/02/2006	HU	UCIN	sangre
532	<i>S. cohnii</i>	10/07/2006	HU	UCIP	catéter
625	<i>S. cohnii</i>	28/07/2006	HU	UCIP	sangre
691	<i>S. cohnii</i>	01/08/2006	HU	UCIN	sangre
849	<i>S. cohnii</i>	23/08/2006	HU	UCIPQ	catéter
881	<i>S. cohnii</i>	01/09/2006	HU	UCIN	catéter
1088	<i>S. cohnii</i>	19/09/2006	HU	MI	sangre
1494	<i>S. cohnii</i>	01/10/2006	HU	Traumatología	hueso
349	<i>S. cohnii</i>	14/10/2006	HU	UCIA	catéter
1786	<i>S. cohnii</i>	17/10/2006	HU	UCIA	sangre
1879	<i>S. cohnii</i>	20/10/2006	HU	Traumatología	hueso
2074	<i>S. cohnii</i>	22/10/2006	HU	Traumatología	hueso
2777	<i>S. cohnii</i>	22/11/2006	HU	UCIN	catéter
2909	<i>S. cohnii</i>	04/12/2006	HU	UCIN	catéter
3271	<i>S. cohnii</i>	04/01/2007	HU	UCIN	catéter
3281	<i>S. cohnii</i>	04/01/2007	HU	UCIN	sangre
3319	<i>S. cohnii</i>	18/02/2007	HU	UCIN	sangre
8180	<i>S. cohnii</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
9924	<i>S. cohnii</i>	16/12/2010	HCG	UCIP	sangre
11507	<i>S. cohnii</i>	03/12/2011	HU	UCIN	sangre
12574	<i>S. cohnii</i>	18/06/2012	HU	UCIP	sangre
12629	<i>S. cohnii</i>	26/06/2012	HU	UCIP	sangre
13985	<i>S. cohnii</i>	30/12/2012	HU	UCIP	sangre
397	<i>S. hominis</i>	01/06/2006	HU	UCIN	sangre
2593	<i>S. hominis</i>	02/11/2006	HU	UCIN	sangre
8115	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIPQ	sangre
8122	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
8125	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
8127	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
8129	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
8144	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
8179	<i>S. hominis</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
9241	<i>S. hominis</i>	20/07/2009	HU	UCIN	sangre
9984	<i>S. hominis</i>	16/12/2010	HCG	UCIN	sangre
9987	<i>S. hominis</i>	16/12/2010	HCG	UCIA	sangre
9989	<i>S. hominis</i>	16/12/2010	HCG	UCIA	sangre

N° aislamiento	Identificación	Fecha de colección	Hospital^a	Sala^b	Espécimen
9994	<i>S. hominis</i>	16/12/2010	HCG	MI	sangre
10239	<i>S. hominis</i>	19/03/2011	HCG	UCIP	sangre
10866	<i>S. hominis</i>	20/07/2011	HU	UCIPQ	sangre
11556	<i>S. hominis</i>	05/11/2011	HCG	UCIP	sangre
11477	<i>S. hominis</i>	25/11/2011	HU	UCIA	sangre
11559	<i>S. hominis</i>	05/12/2011	HU	UCIP	sangre
11564	<i>S. hominis</i>	05/12/2011	HCG	UCIP	sangre
11565	<i>S. hominis</i>	05/12/2011	HCG	UCIP	sangre
11569	<i>S. hominis</i>	05/12/2011	HCG	MI	sangre
11768	<i>S. hominis</i>	25/01/2012	HU	UCIA	sangre
12019	<i>S. hominis</i>	08/03/2012	HU	UCIPQ	sangre
12020	<i>S. hominis</i>	08/03/2012	HU	UCIPQ	sangre
12039	<i>S. hominis</i>	16/03/2012	HU	UCIPQ	sangre
12096	<i>S. hominis</i>	22/03/2012	HU	UCIPQ	sangre
12297	<i>S. hominis</i>	09/05/2012	HU	UCIPQ	sangre
12585	<i>S. hominis</i>	20/06/2012	HU	Urgencias	sangre
12702	<i>S. hominis</i>	29/06/2012	HCG	Nefrología	sangre
12703	<i>S. hominis</i>	29/06/2012	HCG	Geriatría	sangre
12705	<i>S. hominis</i>	29/06/2012	HCG	UCIA	sangre
12706	<i>S. hominis</i>	29/06/2012	HCG	UCIA	sangre
12714	<i>S. hominis</i>	29/06/2012	HCG	Hematología	sangre
12716	<i>S. hominis</i>	29/06/2012	HCG	MI	sangre
13485	<i>S. hominis</i>	24/10/2012	HU	UCIA	sangre
13615	<i>S. hominis</i>	05/11/2012	HCG	UCIA	sangre
13617	<i>S. hominis</i>	05/11/2012	HCG	UCIA	sangre
13671	<i>S. hominis</i>	13/11/2012	HU	UCIPQ	sangre
14104	<i>S. hominis</i>	21/01/2013	HU	UCIPQ	sangre
14182	<i>S. hominis</i>	30/01/2013	HU	Traumatología	sangre
14260	<i>S. hominis</i>	11/02/2013	HU	UCIA	sangre
14570	<i>S. hominis</i>	14/03/2013	HCG	UCIP	sangre
14572	<i>S. hominis</i>	14/03/2013	HCG	MI	sangre
14601	<i>S. hominis</i>	14/03/2013	HCG	UCIN	sangre
14618	<i>S. hominis</i>	14/03/2013	HCG	UCIN	sangre
13-387	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	UCIP	sangre
13-394	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	MI	sangre
13-422	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	UCIA	sangre
13-427	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	UCIN	sangre
13-431	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	UCIP	sangre

N° aislamiento	Identificación	Fecha de colección	Hospital ^a	Sala ^b	Espécimen
13-435	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	Nefrología	sangre
13-438	<i>S. hominis</i>	22/05/2013	HCG	Nefrología	sangre
13-600	<i>S. hominis</i>	13/06/2013	HU	UCIA	sangre
13-696	<i>S. hominis</i>	27/06/2013	HU	UCIA	sangre
13-2118	<i>S. hominis</i>	08/11/2013	HU	UCIA	sangre
13-2281	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2300	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2322	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2350	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2355	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2356	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2357	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2361	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
13-2374	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HU	UCIN	sangre
13-2382	<i>S. hominis</i>	22/11/2013	HCG	UCIP	sangre
14-639	<i>S. hominis</i>	27/02/2014	HU	UCIA	sangre
880	<i>S. sciuri</i>	01/09/2006	HU	UCIA	catéter
882	<i>S. sciuri</i>	01/09/2006	HU	UCIN	catéter
964	<i>S. sciuri</i>	11/09/2006	HU	UCIA	catéter
1085	<i>S. sciuri</i>	19/09/2006	HU	UCIN	sangre
1090	<i>S. sciuri</i>	19/09/2006	HU	UCIA	sangre
2076	<i>S. sciuri</i>	22/10/2006	HU	UCIP	sangre
2247	<i>S. sciuri</i>	25/10/2006	HU	Traumatología	hueso
2326	<i>S. sciuri</i>	30/10/2006	HU	UCIP	sangre
3390	<i>S. sciuri</i>	28/02/2007	HU	UCIN	ascitis
8153	<i>S. sciuri</i>	09/06/2009	HCG	UCIP	sangre
14220	<i>S. sciuri</i>	08/02/2013	HU	UCIP	sangre

^aHU: Hospital Universitario “Dr. José E. González”, Monterrey, Nuevo León; HCG: Hospital Civil de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco.

^bCxGral: cirugía general; MI: medicina interna; UCIA: unidad de cuidados intensivos de adultos; UCIN: unidad de cuidados intensivos de neonatos; UCIP: unidad de cuidados intensivos pediátricos; UCIPQ: unidad de cuidados intensivos posquirúrgicos

Resistencia a meticilina y tipificación de SCCmec

N° aislamiento	Sensibilidad a cefoxitina ^a	SCCmec ^b						Tipo SCCmec
		<i>mecA</i>		Clase <i>mec</i>		Tipo <i>ccr</i>		
		Zhang	Kondo	Zhang	Kondo	Zhang	Kondo	
<i>Staphylococcus cohnii</i>								
57	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
532	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
625	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
691	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
849	R	pos	pos	A	A	3	3+4	nuevo
881	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1088	R	pos	pos	A	A	2	2	II
1494	R	pos	pos	A	A	3	3+4	nuevo
349	R	pos	pos	A	A	3	3+4	nuevo
1786	R	pos	pos	B	B	NT	4	VI
1879	R	pos	pos	NT	NT	5	5	NT
2074	R	pos	pos	A	A	NT	4	VIII
2777	R	pos	pos	A	A	3	3+4	nuevo
2909	R	pos	pos	A	A	3	3+4	nuevo
3271	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3281	R	pos	pos	A	A	5	5	nuevo
3319	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8180	R	pos	pos	A	A	NT	4	VIII
9924	R	pos	pos	B	B	2	2	IV
11507	R	pos	pos	A	A	5	5	nuevo
12574	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
12629	R	pos	pos	A	A	NT	4	VIII
13985	R	pos	pos	A	A	NT	4	VIII
<i>Staphylococcus hominis</i>								
397	R	pos	pos	A	A	1+5	1+5	nuevo
2593	R	pos	pos	A	A	1+5	1+5	nuevo
8115	R	pos	pos	A	A	1+5	1+5	nuevo
8122	R	pos	pos	A	A	1+5	1+5	nuevo
8125	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8127	R	pos	pos	A	A	5	5	nuevo
8129	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
8144	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT

N° aislamiento	Sensibilidad a cefoxitina ^a	SCCmec ^b						
		<i>mecA</i>		Clase <i>mec</i>		Tipo <i>ccr</i>		Tipo SCCmec
		Zhang	Kondo	Zhang	Kondo	Zhang	Kondo	
8179	R	pos	pos	A	A	3	3	III
9241	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9984	R	pos	pos	NT	NT	NT	NT	NT
9987	R	pos	pos	NT	NT	NT	NT	NT
9989	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
9994	R	pos	pos	A	A	4+5	4+5	nuevo
10239	R	pos	pos	B	B	4	4	VI
10866	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
11556	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11477	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11559	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
11564	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
11565	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
11569	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11768	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12019	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12020	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12039	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
12096	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12297	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
12585	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12702	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12703	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12705	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12706	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
12714	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
12716	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13485	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
13615	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13617	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13671	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
14104	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
14182	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
14260	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
14570	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
14572	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo

N° aislamiento	Sensibilidad a cefoxitina ^a	SCCmec ^b						Tipo SCCmec
		<i>mecA</i>		Clase <i>mec</i>		Tipo <i>ccr</i>		
		Zhang	Kondo	Zhang	Kondo	Zhang	Kondo	
14601	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
14618	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-387	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-394	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-422	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-427	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
13-431	R	pos	pos	NT	NT	NT	NT	NT
13-435	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-438	R	pos	pos	B	B	1	1	I
13-600	R	pos	pos	B	B	1	1	I
13-696	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-2118	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-2281	R	pos	pos	B	B	1	1	I
13-2300	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-2322	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-2350	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
13-2355	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-2356	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13-2357	R	pos	pos	NT	NT	NT	NT	NT
13-2361	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
13-2374	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
13-2382	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
14-639	R	pos	pos	A	A	1	1	nuevo
<i>Staphylococcus sciuri</i>								
880	R	pos	pos	A	A	3	3	III
882	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
964	R	pos	pos	A	A	2	2	II
1085	R	pos	pos	NT	NT	NT	4	NT
1090	R	pos	pos	NT	NT	5	5	NT
2076	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
2247	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
2326	R	pos	pos	NT	NT	1+2+5	5	nuevo
3390	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
8153	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT
14220	R	pos	pos	A	A	NT	NT	NT

^aR: resistente; S: sensible. ^bpos: positivo; neg: negativo; NT: no tipificable

Producción y composición de la biopelícula

N° aislamiento	Biopelícula/NaCl		Biopelícula/Glucosa		Detección operón <i>ica</i> ^b
	Índice	Nivel ^a	Índice	Nivel ^a	
<i>Staphylococcus cohnii</i>					
57	0.572	débil	0.084	NP	neg
532	0.515	débil	0.063	NP	neg
625	0.409	débil	0.134	débil	neg
691	0.429	débil	0.131	NP	neg
849	0.452	débil	0.049	NP	neg
881	0.900	fuerte	0.166	débil	<i>icaD</i>
1088	1.416	fuerte	0.042	NP	<i>icaD</i>
1494	0.308	NP	0.047	NP	neg
349	0.566	débil	0.042	NP	neg
1786	0.053	NP	0.107	NP	neg
1879	0.078	NP	0.012	NP	neg
2074	0.398	débil	0.048	NP	neg
2777	0.645	débil	0.110	NP	neg
2909	0.663	débil	0.098	NP	neg
3271	0.400	débil	0.047	NP	neg
3281	0.422	débil	0.109	NP	neg
3319	1.105	fuerte	0.098	NP	<i>icaD</i>
8180	1.318	fuerte	0.053	NP	<i>icaD</i>
9924	0.200	NP	0.079	NP	neg
11507	0.369	NP	0.104	NP	neg
12574	1.163	fuerte	0.112	NP	<i>icaD</i>
12629	0.500	débil	0.077	NP	neg
13985	0.428	NP	0.099	NP	neg
<i>Staphylococcus hominis</i>					
397	5.666	fuerte	4.963	fuerte	<i>icaD</i>
2593	4.956	fuerte	0.981	fuerte	<i>icaD</i>
8115	3.703	fuerte	1.041	fuerte	<i>icaD</i>
8122	2.762	fuerte	1.050	fuerte	<i>icaD</i>
8125	1.159	fuerte	0.982	fuerte	<i>icaD</i>
8127	5.351	fuerte	0.785	fuerte	<i>icaD</i>
8129	1.753	fuerte	1.201	fuerte	<i>icaD</i>
8144	0.675	fuerte	0.574	fuerte	<i>icaD</i>
8179	1.718	fuerte	1.116	fuerte	<i>icaD</i>
9241	6.399	fuerte	6.554	fuerte	<i>icaD</i>

N° aislamiento	Biopelícula/NaCl		Biopelícula/Glucosa		Detección operón <i>ica</i>^b
	Índice	Nivel^a	Índice	Nivel^a	
9984	1.102	fuerte	0.675	fuerte	<i>icaD</i>
9987	0.493	fuerte	0.894	fuerte	<i>icaD</i>
9989	3.686	fuerte	5.594	fuerte	<i>icaD</i>
9994	6.271	fuerte	4.657	fuerte	<i>icaD</i>
10239	1.550	fuerte	0.936	fuerte	<i>icaD</i>
10866	4.992	fuerte	1.507	fuerte	<i>icaD</i>
11556	0.707	fuerte	0.442	fuerte	<i>icaD</i>
11477	6.542	fuerte	8.028	fuerte	<i>icaD</i>
11559	6.014	fuerte	5.477	fuerte	<i>icaD</i>
11564	2.410	fuerte	4.333	fuerte	<i>icaD</i>
11565	5.025	fuerte	2.199	fuerte	<i>icaD</i>
11569	5.348	fuerte	4.972	fuerte	<i>icaD</i>
11768	7.042	fuerte	6.295	fuerte	<i>icaD</i>
12019	0.693	fuerte	1.624	fuerte	<i>icaD</i>
12020	6.318	fuerte	5.738	fuerte	<i>icaD</i>
12039	4.228	fuerte	2.530	fuerte	<i>icaD</i>
12096	2.067	fuerte	1.949	fuerte	<i>icaD</i>
12297	6.705	fuerte	5.129	fuerte	<i>icaD</i>
12585	6.692	fuerte	2.286	fuerte	<i>icaD</i>
12702	4.333	fuerte	2.121	fuerte	<i>icaD</i>
12703	3.070	fuerte	0.663	fuerte	<i>icaD</i>
12705	5.738	fuerte	5.594	fuerte	<i>icaD</i>
12706	5.668	fuerte	1.285	fuerte	<i>icaD</i>
12714	2.359	fuerte	0.772	fuerte	<i>icaD</i>
12716	1.633	fuerte	2.318	fuerte	<i>icaD</i>
13485	0.214	NP	0.220	NP	<i>icaD</i>
13615	0.263	débil	0.658	fuerte	<i>icaD</i>
13617	0.189	NP	0.407	débil	<i>icaD</i>
13671	5.503	fuerte	5.288	fuerte	<i>icaD</i>
14104	3.707	fuerte	1.471	fuerte	<i>icaD</i>
14182	3.105	fuerte	1.459	fuerte	<i>icaD</i>
14260	5.294	fuerte	2.590	fuerte	<i>icaD</i>
14570	0.772	fuerte	0.343	débil	<i>icaD</i>
14572	0.786	fuerte	0.957	fuerte	<i>icaD</i>
14601	4.646	fuerte	4.457	fuerte	<i>icaD</i>
14618	0.509	fuerte	0.441	débil	<i>icaD</i>
13-387	0.366	débil	0.147	NP	<i>icaD</i>

N°aislamiento	Biopelícula/NaCl		Biopelícula/Glucosa		Detección operón <i>ica</i> ^b
	Índice	Nivel ^a	Índice	Nivel ^a	
13-394	1.890	fuerte	1.474	fuerte	<i>icaD</i>
13-422	0.583	fuerte	1.339	fuerte	<i>icaD</i>
13-427	5.932	fuerte	7.756	fuerte	pos
13-431	0.206	NP	0.295	débil	<i>icaD</i>
13-435	8.537	fuerte	7.292	fuerte	<i>icaD</i>
13-438	0.602	fuerte	0.176	NP	<i>icaD</i>
13-600	0.959	fuerte	3.759	fuerte	<i>icaD</i>
13-696	5.834	fuerte	7.322	fuerte	<i>icaD</i>
13-2118	0.932	fuerte	1.541	fuerte	<i>icaD</i>
13-2281	1.062	fuerte	2.492	fuerte	pos
13-2300	6.718	fuerte	4.456	fuerte	<i>icaD</i>
13-2322	7.085	fuerte	6.387	débil	<i>icaD</i>
13-2350	0.697	fuerte	0.347	fuerte	<i>icaD</i>
13-2355	0.399	fuerte	0.489	fuerte	<i>icaD</i>
13-2356	0.233	débil	0.345	fuerte	<i>icaD</i>
13-2357	3.540	fuerte	1.778	fuerte	pos
13-2361	0.496	fuerte	0.431	fuerte	<i>icaD</i>
13-2374	0.362	débil	0.400	fuerte	<i>icaD</i>
13-2382	1.812	fuerte	0.818	fuerte	<i>icaD</i>
14-639	4.508	fuerte	5.346	fuerte	pos
<i>Staphylococcus sciuri</i>					
880	0.633	débil	0.294	NP	neg
882	1.321	fuerte	1.868	fuerte	<i>icaD</i>
964	0.143	NP	0.094	NP	neg
1085	0.425	débil	0.318	débil	<i>icaD</i>
1090	0.135	NP	0.128	NP	neg
2076	1.370	fuerte	0.267	NP	<i>icaD</i>
2247	4.714	fuerte	0.344	débil	<i>icaD</i>
2326	0.145	NP	0.028	NP	neg
3390	0.370	NP	0.399	NP	neg
8153	0.681	NP	0.437	débil	neg
14220	4.520	fuerte	0.859	fuerte	<i>icaD</i>

^aNP: no productor de biopelícula. ^bpos: positivo para *icaA*, *icaB*, *icaD*, *icaC*, *icaR*; neg: negativo; *icaD*: positivo para *icaD*

Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas de y de biopelícula

N° de aislamiento	AMIKACINA				VANCOMICINA				CIPROFLOXACINA				CLORANFENICOL			
	Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula	
	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP
397	2	S	2	S	0.5	S	1	S	2	I	2	I	8	S	8	S
2593	1	S	2	S	0.5	S	1	S	< 0.06	S	< 0.06	S	8	S	8	S
8115	1	S	1	S	4	S	4	S	32	R	32	R	64	R	64	R
8122	2	S	4	S	0.5	S	1	S	4	R	4	R	128	R	256	R
8125	0.5	S	2	S	1	S	4	S	< 0.06	S	0.12	S	4	S	8	S
8127	1	S	1	S	0.25	S	2	S	1	S	2	I	8	S	8	S
8129	4	S	16	S	0.5	S	1	S	1	S	2	I	4	S	8	S
8144	1	S	2	S	1	S	2	S	8	R	32	R	2	S	8	S
8179	32	I	64	R	0.5	S	1	S	2	I	8	R	32	R	64	R
9241	0.12	S	8	S	0.5	S	2	S	0.12	S	2	I	4	S	32	R
9984	64	R	64	R	1	S	2	S	8	R	32	R	128	R	256	R
9987	16	S	128	R	1	S	2	S	64	R	64	R	4	S	8	S
9989	2	S	4	S	1	S	1	S	64	R	64	R	128	R	128	R
9994	16	S	32	I	0.5	S	1	S	< 0.06	S	0.12	S	128	R	128	R
10239	0.5	S	2	S	1	S	4	S	< 0.06	S	0.25	S	4	S	8	S
10866	0.12	S	2	S	0.5	S	0.5	S	64	R	64	R	8	S	8	S
11556	0.25	S	1	S	0.5	S	2	S	< 0.06	S	< 0.06	S	2	S	8	S
11477	0.25	S	0.25	S	0.5	S	1	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	4	S
11559	0.25	S	2	S	0.5	S	1	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	8	S
11564	2	S	16	S	0.5	S	1	S	< 0.06	S	< 0.06	S	64	R	128	R
11565	2	S	8	S	1	S	2	S	64	R	256	R	128	R	128	R
11569	0.5	S	2	S	0.5	S	2	S	< 0.06	S	32	R	2	S	16	I
11768	0.25	S	2	S	0.5	S	2	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	8	S
12019	0.25	S	0.25	S	0.5	S	1	S	< 0.06	S	< 0.06	S	2	S	8	S
12020	0.5	S	1	S	1	S	2	S	< 0.06	S	1	S	2	S	8	S
12039	0.25	S	0.5	S	1	S	2	S	0.25	S	0.5	S	4	S	8	S
12096	1	S	2	S	2	S	2	S	64	R	64	R	64	R	128	R
12297	1	S	4	S	0.5	S	2	S	64	R	256	R	8	S	64	R
12585	0.25	S	0.5	S	0.5	S	1	S	< 0.06	S	0.12	S	4	S	8	S
12702	2	S	4	S	1	S	2	S	128	R	128	R	8	S	16	I

	1	S	1	S	0.5	S	0.5	S	64	R	64	R	2	S	2	S
N° de aislamiento	AMIKACINA				VANCOMICINA				CIPROFLOXACINA				CLORANFENICOL			
	Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula	
	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP
12703	1	S	1	S	0.5	S	0.5	S	64	R	64	R	2	S	2	S
12705	1	S	16	S	0.25	S	1	S	8	R	64	R	2	S	16	I
12706	2	S	2	S	0.5	S	2	S	0.5	S	1	S	8	S	8	S
12714	1	S	1	S	0.5	S	1	S	0.5	S	1	S	8	S	8	S
12716	2	S	2	S	0.5	S	1	S	16	R	32	R	4	S	4	S
13485	0.25	S	0.25	S	0.5	S	0.5	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	1	S
13615	1	S	1	S	0.5	S	0.5	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	4	S
13617	0.5	S	0.5	S	1	S	1	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	4	S
13671	0.25	S	2	S	0.5	S	4	S	0.06	S	0.12	S	4	S	32	R
14104	4	S	4	S	0.5	S	0.5	S	64	R	128	R	2	S	4	S
14182	2	S	2	S	1	S	2	S	32	R	64	R	2	S	4	S
14260	4	S	16	I	0.5	S	2	I	8	R	32	I	64	R	256	R
14570	1	S	1	S	0.25	S	0.25	S	32	R	32	R	64	R	64	R
14572	1	S	1	S	0.5	S	1	S	32	R	32	R	8	S	8	S
14601	4	S	16	S	0.25	S	2	S	0.06	S	0.12	S	32	R	128	R
14618	0.25	S	0.25	S	0.5	S	0.5	S	32	R	32	R	4	S	4	S
13-387	0.25	S	0.5	S	1	S	2	S	64	R	128	R	8	S	16	I
13-394	8	S	16	S	1	S	2	S	8	R	16	R	64	R	128	R
13-422	0.12	S	0.5	S	0.5	S	4	S	< 0.06	S	< 0.06	S	128	R	512	R
13-427	1	S	16	S	0.5	S	4	S	0.06	S	0.12	S	8	S	64	R
13-431	2	S	2	S	1	S	1	S	32	R	32	R	8	S	16	I
13-435	2	S	2	S	1	S	1	S	32	R	32	R	8	S	8	S
13-438	2	S	2	S	1	S	1	S	32	R	32	R	8	S	8	S
13-600	0.25	S	0.5	S	1	S	2	S	< 0.06	S	0.12	S	2	S	4	S
13-696	2	S	2	S	1	S	1	S	32	R	32	R	8	S	8	S
13-2118	2	S	2	S	1	S	1	S	32	R	32	R	8	S	8	S
13-2281	0.25	S	0.25	S	0.5	S	0.5	S	64	R	64	R	8	S	8	S
13-2300	0.12	S	0.25	S	0.5	S	0.5	S	< 0.06	S	< 0.06	S	4	S	1	S
13-2322	1	S	2	S	2	S	2	S	64	R	64	R	64	R	128	R
13-2350	1	S	2	S	1	S	2	S	64	R	128	R	8	S	16	I
13-2355	2	S	32	I	1	S	8	I	16	R	128	R	4	S	32	R
13-2356	1	S	1	S	1	S	2	S	32	R	32	R	8	S	8	S
13-2357	0.5	S	4	S	0.5	S	2	S	32	R	256	R	8	S	64	R

13-2361	0.25	S	0.25	S	1	S	1	S	32	R	32	R	< 0.06	S	< 0.06	S
13-2374	0.5	S	2	S	0.5	S	2	S	32	R	128	R	8	S	32	R
13-2382	2	S	16	S	1	S	8	I	4	R	32	I	8	S	64	R
14-639	4	S	32	I	2	S	8	I	64	R	256	R	8	S	128	R

N° de aislamiento	LINEZOLID				TRIMETOPRIM				ERITROMICINA				OXACILINA			
	Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula	
	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP
397	1	S	1	S	64	R	> 1024	R	> 1024	R	> 1024	R	4	R	128	R
2593	1	S	1	S	16	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	2	R	16	R
8115	0.5	S	2	S	128	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	8	R	256	R
8122	1	S	2	S	64	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	8	R	16	R
8125	1	S	2	S	32	R	128	R	64	R	> 1024	R	< 0.06	S	< 0.06	S
8127	1	S	1	S	64	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	4	R	4	R
8129	0.5	S	1	S	128	R	1024	R	1	S	> 1024	R	0.5	R	1	R
8144	1	S	1	S	4	S	1024	R	16	R	> 1024	R	1	R	8	R
8179	1	S	2	S	128	R	1024	R	0.5	S	> 1024	R	256	R	256	R
9241	1	S	16	R	0.5	S	> 1024	R	0.5	S	> 1024	R	2	R	> 1024	R
9984	1	S	2	S	256	R	1024	R	128	R	> 1024	R	512	R	1024	R
9987	1	S	1	S	256	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	512	R	512	R
9989	1	S	1	S	64	R	64	R	> 1024	R	> 1024	R	8	R	8	R
9994	1	S	2	S	64	R	> 1024	R	> 1024	R	> 1024	R	16	R	32	R
10239	1	S	1	S	> 1024	R	> 1024	R	> 1024	R	> 1024	R	2	R	4	R
10866	1	S	1	S	32	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	2	R	128	R
11556	0.5	S	1	S	0.5	S	2	S	0.25	S	0.5	S	< 0.06	S	< 0.06	S
11477	2	S	2	S	1	S	4	S	0.5	S	0.5	S	< 0.06	S	2	R
11559	1	S	2	S	64	R	> 1024	R	8	R	> 1024	R	0.5	R	2	R
11564	1	S	1	S	64	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	16	R	256	R
11565	1	S	2	S	32	R	1024	R	> 1024	R	> 1024	R	2	R	4	R
11569	0.5	S	2	S	> 1024	R	> 1024	R	0.25	S	> 1024	R	4	R	512	R
11768	1	S	2	S	> 1024	R	> 1024	R	64	R	> 1024	R	0.5	R	2	R
12019	0.5	S	1	S	128	R	1024	R	128	R	> 1024	R	< 0.06	S	< 0.06	S

12020	0.5	S	2	S	32	R	> 1024	R	0.12	S	> 1024	R	0.5	R	32	R
12039	1	S	2	S	128	R	256	R	0.5	S	8	R	8	R	16	R
12096	1	S	2	S	1	S	2	S	256	R	512	R	256	R	512	R
N° de aislamiento	LINEZOLID				TRIMETOPRIM				ERITROMICINA				OXACILINA			
	Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula	
	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP
12297	1	S	4	S	64	R	256	R	256	R	> 1024	R	16	R	64	R
12585	1	S	2	S	2	S	4	S	0.25	S	0.5	S	2	R	512	R
12702	1	S	1	S	64	R	128	R	512	R	1024	R	4	R	8	R
12703	0.5	S	0.5	S	128	R	128	R	256	R	256	R	0.5	R	0.5	R
12705	0.5	S	1	S	64	R	512	R	1024	R	> 1024	R	8	R	64	R
12706	1	S	1	S	64	R	128	R	128	R	1024	R	2	R	4	R
12714	1	S	1	S	32	R	512	R	> 1024	R	> 1024	R	4	R	8	R
12716	0.5	S	1	S	> 1024	R	> 1024	R	64	R	1024	R	1	R	2	R
13485	< 0.06	S	< 0.06	S	1	S	1	S	0.5	R	1	S	1	R	1	R
13615	0.5	S	0.5	S	256	R	256	R	0.25	S	0.25	S	8	R	8	R
13617	2	S	2	S	8	S	8	S	0.5	S	0.5	S	< 0.06	S	< 0.06	S
13671	2	S	8	R	> 1024	R	> 1024	R	0.5	S	8	R	< 0.06	S	1	R
14104	0.5	S	1	S	64	R	128	R	256	R	512	R	1	R	2	R
14182	0.5	S	1	S	8	S	16	R	8	R	16	R	1	R	2	R
14260	1	S	4	S	128	R	512	R	512	R	> 1024	R	2	R	8	R
14570	1	S	1	S	128	R	128	R	256	R	256	R	32	R	32	R
14572	1	S	2	S	128	R	128	R	256	R	512	R	16	R	16	R
14601	4	S	8	R	128	R	512	R	0.5	S	8	R	8	R	32	R
14618	1	S	1	S	2	S	2	S	1	S	8	R	0.5	R	0.5	R
13-387	1	S	2	S	128	R	128	R	256	R	512	R	1	R	2	R
13-394	1	S	2	S	1	S	2	S	512	R	1024	R	2	R	4	R
13-422	1	S	4	S	0.5	S	2	S	256	R	> 1024	R	0.5	R	2	R
13-427	1	S	4	S	32	R	256	R	> 1024	R	> 1024	R	8	R	128	R
13-431	1	S	1	S	256	R	256	R	256	R	512	R	512	R	512	R
13-435	1	S	1	S	256	R	256	R	256	R	256	R	512	R	512	R
13-438	1	S	1	S	256	R	512	R	256	R	256	R	256	R	256	R

13-600	0.5	S	1	S	1	S	2	S	1	S	8	R	< 0.06	S	0.12	S
13-696	1	S	1	S	256	R	256	R	256	R	256	R	256	R	256	R
13-2118	1	S	1	S	256	R	256	R	256	R	256	R	256	R	512	R
13-2281	1	S	1	S	256	R	512	R	256	R	512	R	4	R	4	R
N° de aislamiento	LINEZOLID				TRIMETOPRIM				ERITROMICINA				OXACILINA			
	Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula		Planctónicas		Biopelícula	
	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP	CMI	INTP	CMEB	INTP
13-2300	< 0.06	S	< 0.06	S	32	R	32	R	16	R	< 0.5	S	0.5	R	0.5	R
13-2322	1	S	2	S	1	S	2	S	256	R	512	R	256	R	512	R
13-2350	1	S	2	S	256	R	256	R	256	R	512	R	8	R	16	R
13-2355	4	S	16	R	256	R	> 1024	R	1024	R	> 1024	R	0.5	R	4	R
13-2356	2	S	2	S	256	R	256	R	256	R	512	R	256	R	256	R
13-2357	1	S	4	S	128	R	> 1024	R	> 1024	R	> 1024	R	2	R	16	R
13-2361	< 0.06	S	< 0.06	S	4	R	4	S	8	R	< 0.5	S	0.5	R	2	R
13-2374	1	S	4	S	> 1024	R	> 1024	R	256	R	> 1024	R	2	R	8	R
13-2382	1	S	4	S	256	R	> 1024	R	512	R	> 1024	R	1	R	8	R
14-639	1	S	4	S	> 1024	R	> 1024	R	256	R	> 1024	R	4	R	32	R

INTP: interpretación; CMI: concentración mínima inhibitoria (µg/mL); CMEB: concentración mínima de erradicación de biopelícula (µg/mL); S: susceptible; R: resistente;

ARTÍCULOS

1. Artículo publicado:

- **Título:** Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood.
- Revista: Plos One

2. Artículo enviado:

- **Título:** Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of *Staphylococcus cohnii* from human patients.
- **Revista:** Standards in Genomic Sciences.
- **Estatus:** enviado desde el 23/09/2015, respuesta a las primeras observaciones y actualmente bajo una segunda revisión.

3. Artículo en proceso de escritura:

- **Título:** Biofilm composition and Antibiotic Susceptibility of clinical isolates of *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus sciuri*.

RESEARCH ARTICLE

Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood

Soraya Mendoza-Olazarán¹, Rayo Morfín-Otero², Licet Villarreal-Treviño³, Eduardo Rodríguez-Noriega², Jorge Llaca-Díaz⁴, Adrián Camacho-Ortiz⁵, Gloria M. González⁶, Néstor Casillas-Vega¹, Elvira Garza-González^{1,4*}

1 Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, **2** Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde, and Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México, **3** Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, **4** Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, **5** Servicio de Infectología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, **6** Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

* elvira_garza_gzz@yahoo.com



OPEN ACCESS

Citation: Mendoza-Olazarán S, Morfín-Otero R, Villarreal-Treviño L, Rodríguez-Noriega E, Llaca-Díaz J, Camacho-Ortiz A, et al. (2015) Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. PLoS ONE 10(12): e0144684. doi:10.1371/journal.pone.0144684

Editor: Malcolm James Horsburgh, University of Liverpool, UNITED KINGDOM

Received: July 2, 2015

Accepted: November 23, 2015

Published: December 14, 2015

Copyright: © 2015 Mendoza-Olazarán et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files, and the authors confirm that this is the underlying data necessary to replicate the study conclusions.

Funding: This work was supported by grant CB-2011-01-167802 from CONACyT (Mexican Council for Science and Technology).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Objectives

We aimed to characterise the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type, genetic relatedness, biofilm formation and composition, *icaADBC* genes detection, *icaD* expression, and antibiotic susceptibility of planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus hominis* isolates from blood.

Methods

The study included 67 *S. hominis* blood isolates. Methicillin resistance was evaluated with the cefoxitin disk test. *mecA* gene and SCC*mec* were detected by multiplex PCR. Genetic relatedness was determined by pulsed-field gel electrophoresis. Biofilm formation and composition were evaluated by staining with crystal violet and by detachment assay, respectively; and the biofilm index (BI) was determined. Detection and expression of *icaADBC* genes were performed by multiplex PCR and real-time PCR, respectively. Antibiotic susceptibilities of planktonic cells (minimum inhibitory concentration, MIC) and biofilm cells (minimum biofilm eradication concentration, MBEC) were determined by the broth dilution method.

Results

Eighty-five percent (57/67) of isolates were methicillin resistant and *mecA* positive. Of the *mecA*-positive isolates, 66.7% (38/57) carried a new putative SCC*mec* type. Four clones

were detected, with two to five isolates each. Among all isolates, 91% (61/67) were categorised as strong biofilm producers. Biofilm biomass composition was heterogeneous (polysaccharides, proteins and DNA). All isolates presented the *icaD* gene, and 6.66% (1/15) isolates expressed *icaD*. This isolate presented the five genes of *ica* operon. Higher BI and MBEC values than the MIC values were observed for amikacin, vancomycin, linezolid, oxacillin, ciprofloxacin, and chloramphenicol.

Conclusions

S. hominis isolates were highly resistant to methicillin and other antimicrobials. Most of the detected SCCmec types were different than those described for *S. aureus*. Isolates indicated low clonality. The results indicate that *S. hominis* is a strong biofilm producer with an extracellular matrix with similar composition of proteins, DNA and *N*-acetylglucosamine; and presents high frequency and low expression of *icaD* gene. Biofilm production is associated with increased antibiotic resistance.

Introduction

Staphylococcus hominis, a coagulase-negative staphylococcus (CoNS) species, is an opportunistic pathogen that is one of the three most common isolates found in the blood of neonates and immunosuppressed patients.[1–3] In recent years, reports of *S. hominis* infection-induced bacteraemia, septicaemia, endophthalmitis, and endocarditis have increased in frequency.[2–7] *S. hominis* infections are often highly resistant to antibiotics and thus, are difficult to treat. Resistance to linezolid and vancomycin has been reported in several isolates [8–10]. Furthermore, methicillin resistance, which is associated with the *mecA* gene, has been found in up to 80% *S. hominis* isolates [11–13]. The *mecA* gene resides within a mobile genetic element called the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec)[14] that was first described in *Staphylococcus aureus*. This element is related to *mec* gene complex classes A–E and *ccr* gene complex classes 1–8. Eleven types of SCCmec have been described (http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html); however, *S. hominis* is prone to carry novel SCCmec types because of the presence of high-frequency non-typeable and new combinations of *mec* and *ccr* gene complexes. [11, 13, 15]

Nosocomial infections by CoNS are primarily associated with the use of medical devices, likely because of biofilm formation [16–18]. A biofilm is a community of bacteria living in an organised structure as cellular clusters or microcolonies. The biofilm is encapsulated in a matrix composed of an extracellular polymeric substance that is separated by open water channels. The water channels act as a primitive circulatory system to deliver nutrients and remove metabolic waste products. The biofilm allows bacteria to adhere to inert materials and to experience increased antibiotic resistance.[19, 20] Several CoNS species are more resistant to antibiotics when in a biofilm than when they exist as free-swimming planktonic cells. Therefore, because they were designed for planktonic cells, antibiotic treatments based on the protocols provided by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) may fail to clear biofilm-related CoNS infections.[21]

A recent study described *S. hominis* biofilm production, their architecture and *icaADBC* frequency. [22] However, compared to other CoNS species, *S. hominis* is not categorised as a strong biofilm producer. Moreover, little information is available regarding the antibiotic

susceptibility of *S. hominis* cells in a biofilm. Therefore, we aimed to characterise the SCCmec type, genetic relatedness, and ability to form biofilms for 67 clinical isolates of *S. hominis* obtained from blood cultures. The antibiotic susceptibilities of planktonic and biofilm cells of these strains were also compared.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was performed with approval from the Ethics Committee of the School of Medicine of the Universidad Autónoma de Nuevo León (approval no. GA14-009). Because patient information was anonymized, only microbiological data were analysed. Therefore, the local ethics committee did not require informed consent.

Clinical isolates

From January 2006 to December 2014, a total of 67 *S. hominis* clinical isolates from blood cultures were collected from two hospitals in Mexico: Hospital Civil Fray Antonio Alcalde (Guadalajara, Jalisco) and Hospital Universitario Dr José Eleuterio González (Monterrey, Nuevo León). All isolates were causative agents of laboratory-confirmed bloodstream infection according to criteria of the US Centers for Disease Control (http://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/17pscnosindef_current.pdf). Isolates were kept at -70°C in *Brucella* broth containing 15% glycerol. Only one isolate per patient was used in the study.

Isolate identification

Isolates were identified at the species level by API Staph Galleries (bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA), according to the manufacturer's instructions. Species identification was confirmed by partial sequencing of the 16S rRNA, as previously described.[23] Sequencing was performed at the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. DNA sequences were compared to genes in the US National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank by using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Methicillin resistance, SCCmec typing, and genetic relatedness

Methicillin resistance was evaluated by the cefoxitin disk test. The *mecA* gene was detected by polymerase chain reaction (PCR).[24] In the cefoxitin disk assay, results under 24 mm indicated resistant isolates, and results of 25 mm or greater indicated susceptible isolates.[25]

Identification of the SCCmec element type, according to the *ccr* class (*AB1*, *AB2*, *AB3*, or *C*) and *mec* class (*A*, *B*, or *C*), was performed as previously described.[24, 26] The *ccrAB4* type was determined by the method used by Oliveira *et al.*[27] with the modifications proposed by Zhang *et al.*[12] All SCCmec typing experiments were performed in duplicate. SCCmec was considered 'non-typeable' when the *ccr* and/or the *mec* complex did not amplify by PCR with any of the primer pairs. SCCmec was classified as 'new' when isolates contained a different combination of *ccr* and *mec* complexes as those previously reported for *S. aureus* by the International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (<http://www.sccmec.org/>).

Pulsed-field gel electrophoresis was performed as described for *S. aureus* [28], including modifications in the restriction enzyme and running conditions as described by Bouchami *et al.*[11] Specifically, isolate samples were digested with *XhoI*, and bands were separated by a CHEF-DRIII instrument (Bio-Rad Laboratories). Banding patterns were analysed visually by counting the bands using Labworks 4.5 software with 1% tolerance and 0.5 optimization

settings. Similarity coefficients were generated from a similarity matrix, which was calculated with the Jaccard coefficient in the SPSS 22.0 software package. To define a clone two criterion previously described were used: a similarity cut-off of 80% [29] and a difference of \leq six bands [30].

Phenotypic biofilm assay

Semi-quantitative determination of biofilm formation was performed in duplicate by crystal violet staining as previously described [18, 31], with modifications to the normalisation approaches that compensate for growth rate differences [32, 33]. All isolates were tested in quadruplicate in two independent experiments. Polystyrene, 96-well, flat-bottom, non-treated plates with a low-evaporation lid were used for this assay.

The cut-offs proposed by Christensen *et al.* were used to classify the level of biofilm production [18]. Isolates with an OD of 0.25 or greater were considered to be strong biofilm producers, whereas isolates with ODs between 0.12 and 0.24 were considered to be weak biofilm producers. For quantitative analysis, the biofilm index (BI) was determined. For each experiment, the OD₆₀₀ measurement for all cells (biofilm + planktonic cells OD₆₀₀) was divided by the mean biofilm OD₅₇₀ measurement of three wells per isolate: BI = total cells OD₆₀₀ / biofilm density OD₅₇₀. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (biofilm producer and *ica* operon-negative), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (biofilm producer and *ica* operon-positive) and *S. hominis* ATCC 27844 (biofilm non-producer and *ica* operon-negative) were used as control organisms.

Biofilm detachment assays

Detachment assays were performed using sodium *meta*-periodate (NaIO₄) to degrade β -1,6-linked polysaccharides, proteinase K to degrade proteins and DNase I to degrade DNA as described previously. [16] Briefly, each mature biofilms cultivated in tryptic soy broth with glucose 1% (TSB_{glu1%}) were washed three times with PBS and were treated with (a) 40 mM NaIO₄ in double-distilled H₂O, (b) 0.1 mg/mL proteinase K (BIO-37037; Bioline) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) with 100 mM NaCl or (c) 0.5 mg/ml DNase I (DN25; Sigma) in 5 mM MgCl₂ for 24 h at 37°C. After, the biofilms were stained with crystal violet as described above. [18] Three wells containing uninoculated TSB_{glu1%} served as sterility control son each plate; the OD of these wells was used as spectrophotometric blanks. For each parallel run, the highest and the lowest OD values were removed to exclude outliers, and the remaining values were averaged. Percent detachment was calculated by the average difference between the treated wells and the untreated wells. The detachment results were classified as no detachment (<10%), intermediate detachment (10 to 50%), moderately strong (51–75%), and strong detachment (>75%) All isolates were tested in three parallel runs *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 was included as a control (PIA as most abundant component).

*ica*A_{DBC} operon detection and expression of the *ica*D

The *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* and *icaR* genes were detected by multiplex PCR.[34]. The *icaD* gene expression was detected in 15 selected isolates. *Staphylococcus hominis* cells were cultured in the same conditions used for biofilm formation (TSB_{1%} at 37°C) and harvested at mid-log phase (16 h). RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The cDNA synthesis was performed using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, CA, USA). Real-time PCR was performed using iQ SYBR Green Supermix with the primers previously reported [34] and the PCR conditions reported by Ciu *et al* [35]. *tuf* gene was used as internal control for normalization gene for

expression of *icaD*. Amplification of *icaD* and *tuf* genes was detected by the presence of products of T_m of 81.12 and 72.14 in the melting curve, respectively. Amplification was confirmed by the presence of the corresponding PCR products on 2% agarose gel. *icaD* gene was considered as up-regulated if there was a relative change in expression higher than two (2¹) than the *tuf* gene.

Minimal inhibitory concentration (MIC)

Susceptibility testing was performed by using the broth microdilution method, as recommended by the CLSI.[25] The tested antibiotics included erythromycin, trimethoprim, amikacin, vancomycin, linezolid, oxacillin, ciprofloxacin, and chloramphenicol (Sigma Aldrich, Toluca, Mexico).

Minimum biofilm eradication concentration (MBEC)

The assay reported by Ceri, H *et al.*[36] was used to determine the antibiotic susceptibility of biofilm cells. Bacterial biofilms were grown on polystyrene pegs in the Calgary Biofilm Device by utilising a microtitre plate (the MBEC™-Physiology and Genetics assay, Innovotech, Edmonton, AB, Canada), and following the manufacturer's instructions. To begin, a bacterial inoculum of 1.0 McFarland and diluted 1:50 (~ 10⁸ CFU/mL) into TSB_{glu1}%. To establish biofilm, 100 μL of the inoculum was added to each well of a 96-well microtiter plate. The peg lid was then fitted inside of this and the assembled device was placed on a gyratory shaker at ~150 revolutions per minute (rpm) in a humidified incubator for 18–24 h at 35°C. After incubation, pegs lid were rinsed twice with 100 μL PBS per peg to remove non-adherent cells and transfer the peg lid a new microtiter plate with 100 μL of twofold serial dilutions of antibiotics ranging from 1024 μg/mL to 0.06 μg/mL, in Müller-Hinton broth (MHB) and MHB 1% NaCl (for oxacillin). Microtiter plates were then incubated at 35°C for 18 or 24 h, depending on the antibiotics tested. After antibiotic exposure, the peg lid was removed and rinsed twice with PBS and the biofilm disrupted by sonication for 8 s at 10% of the maximum amplitude (Branson 5800 Ultrasonic Cleaner) into MHB (recovery plate). The recovery plate was incubated for 24 h at 35°C. It was visually checked for turbidity in the wells and the MBEC was defined as minimum concentration of antimicrobial that eradicates the biofilm. Clear wells are evidence of eradication.

For the data analysis, it was considered as a difference significant when the isolates showed an increase > 2 fold for amikacin, ciprofloxacin, erythromycin, linezolid, oxacillin and trimethoprim, and an increase of > 3 fold for chloramphenicol in MBEC compared to MIC. This was established according at acceptable range of MIC for antibiotic quality control for *Staphylococcus aureus* ATCC 25913.

The MIC and MBEC were measured on three different occasions. In the case of non-concordance of the results, a fourth test was performed

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) tests with the post-hoc Sidak correction were used to compare differences between MBEC, MIC, and BI values and averages (SPSS 20.0 software). A *p*-value of 0.05 or less was considered statistically significant.

Results

Methicillin resistance, SCC_{mec} typing, and genetic relatedness

The cefoxitin disk test revealed that 85% (57/67) of isolates were resistant to methicillin and that all of these isolates tested positive for the *mecA* gene. Of the 57 *mecA*-positive isolates,

66.7% (38/57) had a new SCCmec complex. Of these isolates carrying new SCCmec complexes, 32 amplified mec complex A and *ccrAB1* (New1), four isolates carried mec complex A, *ccrAB1*, and *ccrC* (New2), one isolate had mec complex A and *ccrC* (New3), and one isolate had mec complex A, *ccrAB4*, and *ccrC* (New4). Isolates with non-typeable SCCmec complexes represented 24.6% of the total (14/57). Of these, ten isolates had only mec class A (NT1) and four isolates did not have *ccr* or *mec* (NT2). Only 8.8% (5/57) of isolates carried a typeable SCCmec complex: three had type I, one had type III, and one had type VI SCCmec complexes.

Pulsed-field gel electrophoresis of *S. hominis* isolates revealed 62 different restriction patterns that had at least three band differences between each pattern. Four clones were detected (Fig 1). Clone A was represented by five isolates that were all recovered in November 2013 from the paediatric intensive care unit of Hospital Civil in Guadalajara, Mexico. Two isolates represented clones B, C, and D; each clone was isolated in the same month and from the same area and hospital.

Biofilm formation and *icaADBC* operon

Of the 67 *S. hominis* isolates, 91% were categorised as strong biofilm producers as defined by the cut-off values proposed by Christensen *et al.*[18] Five isolates (7.5%) were identified as weak biofilm producers and three isolates (1.5%) as non-producers. The average BI values were 0.181, 0.360, and 2.542 for non-weak, and strong biofilm production, respectively. NaIO₄, proteinase K and DNase showed a similar effect on reduction biofilm biomass (Figs 1 and 2). The *icaD* gene was detected in all isolates (100%) and four (7.5%) isolates harboured all five *ica* genes. Expression of *icaD* gene was performed in 15 strong biofilm producers *icaD* positive isolates, from which, only 1/15 (6.66%) isolate (NL14-639) expressed *icaD*. This isolate expressed *icaD* more than two times than *tuf* gene that was used as internal control for normalization and presented the five genes of *ica* operon. We did not find an association between clone type and biofilm production, as all clones were strong biofilm producers (Fig 1).

MIC and MBEC

For almost all antibiotics tested, the resistance rate was significantly higher for biofilm cells than for planktonic cells (Table 1). The minimum concentrations that eradicated the biofilms of 50% and 90% of isolates (MBEC₅₀ and MBEC₉₀, respectively) were more than two-fold higher than the minimal concentrations that inhibited 50% and 90% of isolates in planktonic form (MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively) for erythromycin, trimethoprim, amikacin, and vancomycin. This difference was also observed for oxacillin and ciprofloxacin, but only for MBEC₅₀ compared to MIC₅₀. For linezolid, the MBEC₉₀ value was two-fold higher than the MIC₉₀ value. We did not observe a significant difference between the MBEC and MIC values for chloramphenicol; however, the chloramphenicol resistance rate of biofilm cells was still two-fold higher than the resistance rate of planktonic cells. None of the 67 isolates tested in this study were resistant to vancomycin or linezolid as planktonic cells. However, 4.5% of isolates showed intermediate MIC values for vancomycin as biofilm cells, and 6% of the isolates were resistant to linezolid as biofilm cells.

Antibiotic susceptibility and biofilm index

We observed higher BI and MBEC values compared to the MIC values for the following antibiotics: amikacin ($p < 0.0001$), vancomycin ($p < 0.0001$), linezolid ($p < 0.0001$), oxacillin ($p < 0.0001$), ciprofloxacin ($p = 0.0005$), and chloramphenicol ($p < 0.0001$) (Fig 3). This analysis was not determined for erythromycin and trimethoprim because several isolates had values above the upper limit of detection (>1024 mg/L) in both planktonic and biofilm cells.

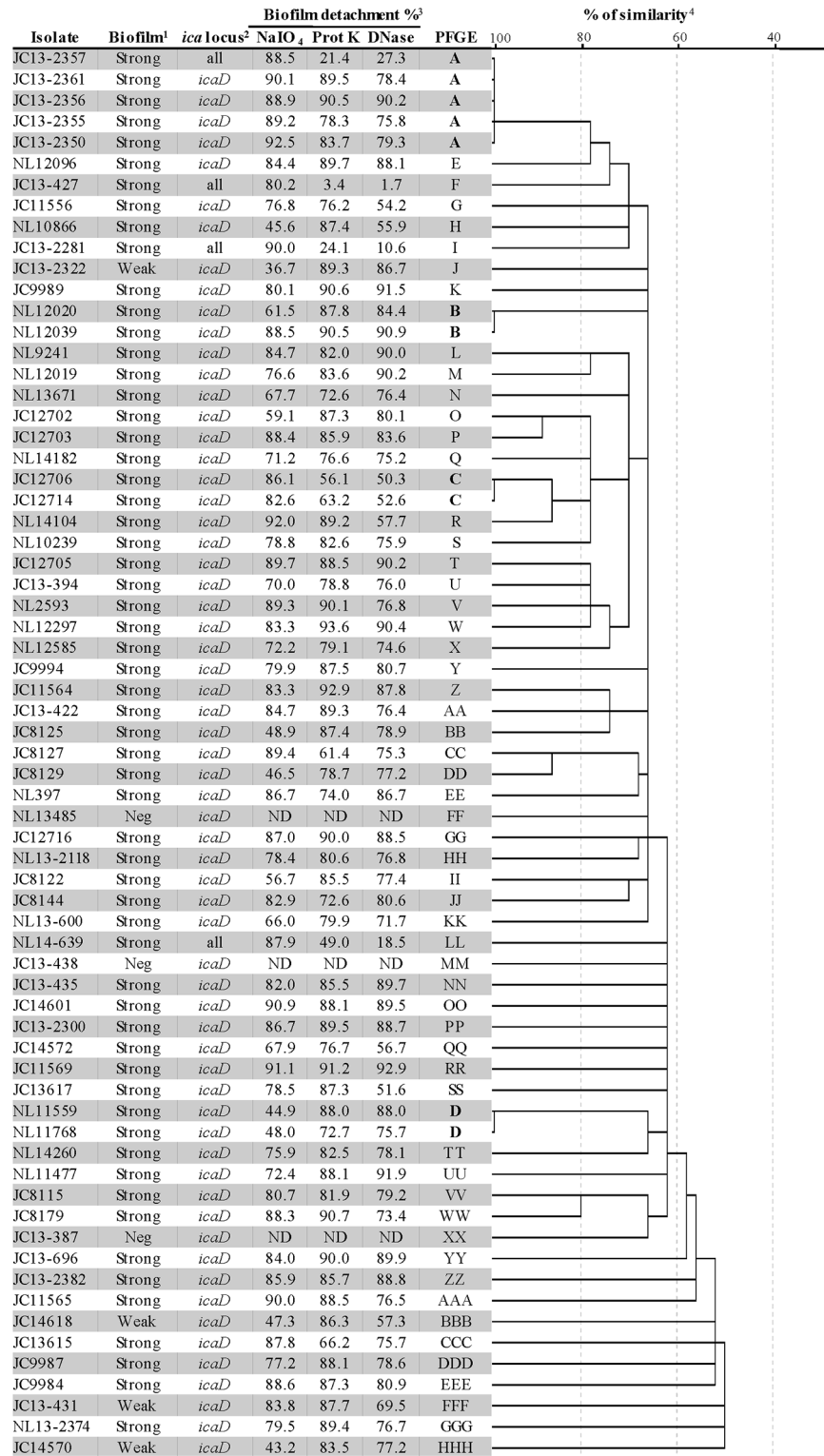


Fig 1. Pulsed-field gel electrophoresis dendrogram and biofilm production of *S. hominis* isolates.
¹Biofilm production level: OD <0.12 negative, 0.12–0.24 weak and >0.25 strong. Neg: negative. ²All: positive for *icaR*, *icaA*, *icaD*, *icaB*, and *icaC*. ³ND non-determinate. ⁴Similarity coefficients were generated from a similarity matrix calculated with the Jaccard coefficient using SPSS 22.0 software.

doi:10.1371/journal.pone.0144684.g001

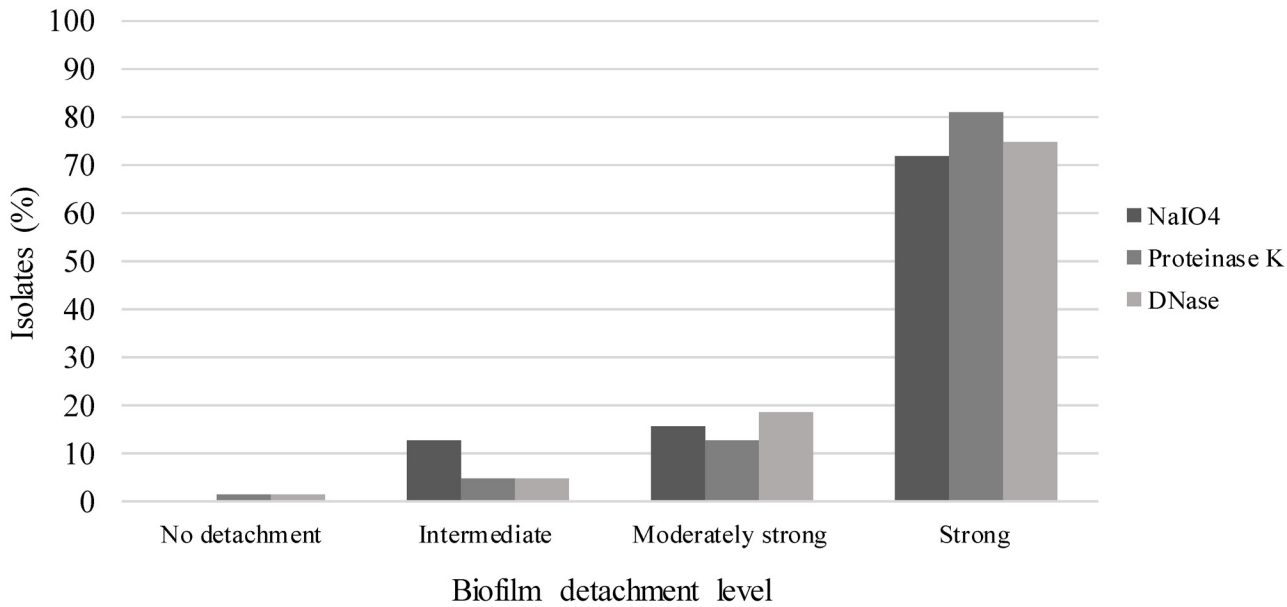


Fig 2. Biofilm detachment with NaIO₄, proteinase K and DNase. Biofilm detachment level of 64 biofilm producers *S. hominis* isolates after treatment with NaIO₄, proteinase K and DNase.

doi:10.1371/journal.pone.0144684.g002

Table 1. Antibiotic resistance of biofilm and planktonic cells of the isolates.

Antibiotic ^a	Cells	(mg/L) ^b		%R (n) ^c	%S (n) ^c
		MIC ₅₀ MBEC ₅₀	MIC ₉₀ MBEC ₉₀		
ERY	Planktonic	256	512	77.6 (52)	23.4 (15)
	Biofilm	> 1024	> 1024	88.1 (59)	11.9 (8)
TMP	Planktonic	64	256	79.1 (53)	20.9 (14)
	Biofilm	512	> 1024	82.1 (55)	17.9 (12)
AMK	Planktonic	1	2	3 (2)	97 (65)
	Biofilm	4	16	9 (6)	91 (61)
VAN	Planktonic	0.5	1	0 (0)	100 (67)
	Biofilm	2	4	4.5 (3)*	95.5 (64)
LZD	Planktonic	1	1	0 (0)	100 (67)
	Biofilm	2	4	6 (4)	94 (63)
OXA	Planktonic	2	256	85 (57)	15 (10)
	Biofilm	8	512	92.5 (62)	7.5 (5)
CIP	Planktonic	8	64	58.2 (39)	41.8 (28)
	Biofilm	32	128	62.7 (42)	37.3 (25)
CHL	Planktonic	8	64	22.4 (15)	77.6 (52)
	Biofilm	8	128	44.8 (30)	55.2 (37)

^aERY: erythromycin; TMP: trimethoprim; AMK: amikacin; VAN: vancomycin; LZD: linezolid; OXA: oxacillin; CIP: ciprofloxacin; CHL: chloramphenicol.

^bMIC₅₀ and MIC₉₀: minimal concentrations that inhibit 50% and 90% of isolates, respectively (planktonic cells). MBEC₅₀ and MBEC₉₀: minimum concentrations that eradicate the biofilm of 50% and 90% of isolates, respectively. Values in bold indicate a significant difference in MICs and MBECs between planktonic and biofilm cells;

^c%R and %S: percentage of isolates resistant and susceptible, respectively. This classification was according to cut-offs of proposed by the CLSI.

*Value intermediate.

doi:10.1371/journal.pone.0144684.t001

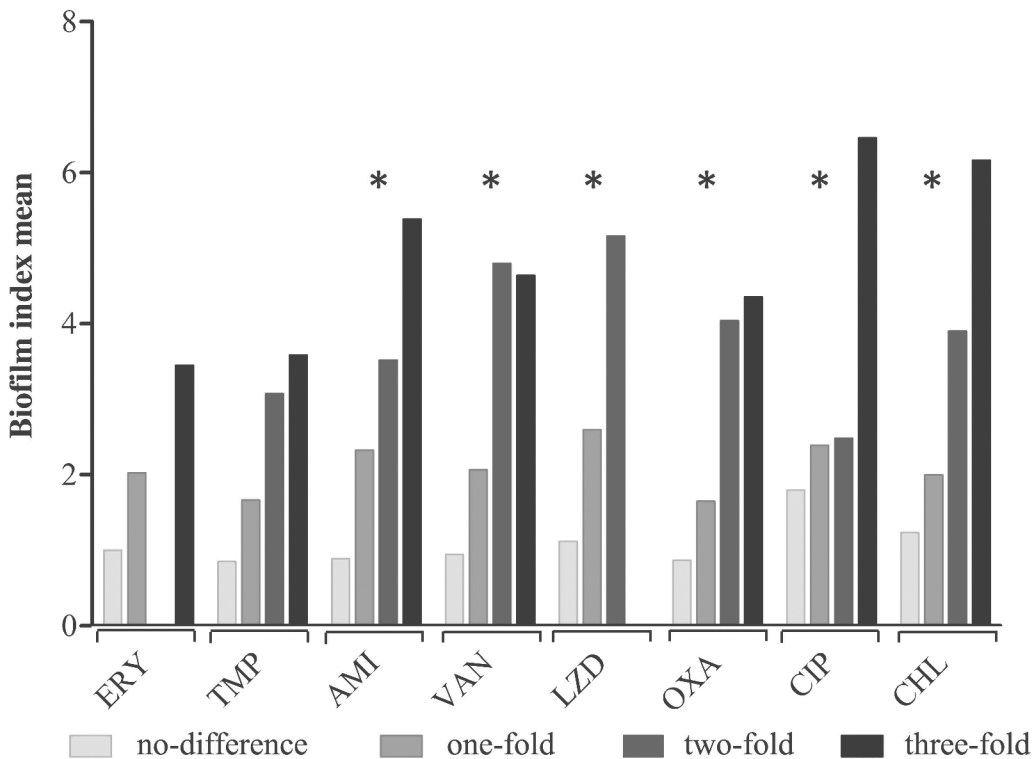


Fig 3. Increase BI mean and correlation with the differences in values observed between MIC and MBEC for all 67 isolates: no difference, one-fold increase, two-fold increase, three-fold increase. *Indicates a correlation between increases in antibiotic resistance (between MBEC and MIC) and BI mean. $p < 0.05$ by both ANOVA and Chi-square tests.

doi:10.1371/journal.pone.0144684.g003

Determinations at higher concentrations could not be performed because the antibiotic does not dilute at such concentration; therefore, we could not analyse the difference between MBEC and MIC values for these antibiotics.

Discussion

Understanding the relative pathogenicity and virulence of *S. hominis* is crucial, in light of the recent increase antibiotic-resistant *S. hominis* infections, particularly those resistant to vancomycin and linezolid and those carrying the SCCmec gene.[10, 37] Recent phenotypic and molecular characterisations of *S. hominis* clinical isolates have found that *S. hominis* has low clonality, high methicillin resistance, and variable biofilm production. These studies have shown that *S. hominis* isolates frequently carry the *mecA* gene (likely as new SCCmec complex types), with a high prevalence of the *icaADBC* gene.[11–13, 22, 38] Herein, we have demonstrated that clinical isolates of *S. hominis* are less susceptible to antibiotics as biofilm cells.

Some studies have shown that production of biofilm in *S. hominis* is likely *ica*-independent, such as has been reported for *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus* and *S. lugdunensis*. [16, 22, 39–41]. The *S. hominis* isolates included in this study were strong biofilm producers, had a high frequency of the *icaD* gene and a low expression of this gene (6.66%). Has been proposed that *icaD* has co-expression with the *icaA* gene, which is responsible for polysaccharide synthesis by the production of *N*-acetylglucosamine oligomers and complete transferring the growing sugar chain to the cell surface. [35, 42] In this study, the *icaD* expression was demonstrated only in one isolate and NaIO₄, proteinase K and DNase showed similar effect on reduction

biofilm biomass (Fig 2). Therefore, the *N*-acetylglucosamine is not the major component, but one of the components of biofilm in *S. hominis*.

Biofilm production is an important virulence factor because biofilms facilitate bacterial adherence to biomedical surfaces (e.g. catheters, prosthetics, and cardiac valves) and entrance into the bloodstream.[19] Notably, this species has not previously been categorised as a major biofilm producer. Two previous studies reported that less than half of the *S. hominis* isolates were biofilm producers, or that the isolates were weak biofilm producers. However, these studies were performed on isolates obtained from surgical wounds, blood, catheters, or cerebrospinal fluid.[17, 22, 43] The discrepancy in the ability of these isolates to produce biofilm compared to the isolates we examined may be explained by the origin of the specimens used. Our strains were causative agents of laboratory-confirmed bloodstream infections and exclusively isolated from blood; therefore, these strains likely produced biofilm as a way to get into the bloodstream.

We observed differences in susceptibility between planktonic and biofilm cells for all antibiotics tested. Overall, isolates were more resistant to antibiotics as biofilms (Table 1). Cells may be more resistant to antibiotics as biofilms because they have reduced metabolic and growth rates (particularly cells deep within the biofilm), or because the biofilm matrix may adsorb or react with the antibiotics, thereby reducing the amount of antibiotics available to interact with cells in the biofilm. Another possibility is that the biofilm cells may have antibiotic tolerance. As a result of these factors, cells in the biofilm may be physiologically distinct from planktonic cells and, thus, express specific protective factors.[19, 20]

Antibiotic treatment protocols based on standard *in vitro* susceptibility tests designed for planktonic bacteria may fail to eradicate biofilm-producing *S. hominis* infections. This possibility is particularly concerning for monotherapies with vancomycin or linezolid, antibiotics to which *S. hominis* biofilms were remarkably resistant. Given these data, it may be more useful to base *S. hominis* treatment protocols on *in vitro* antibiotic susceptibility tests on biofilm cells. Our results are in agreement with reports on other CoNS species.[21] Caution should be taken before extrapolating these results to all CoNS species because of the high phenotypic and genetic variability in this species.

The BI value was associated with differences between the MBEC and MIC values. For example, with increasing BI values, we saw increasing differences between the MBEC and MIC values (Fig 3). This result suggests that the level of biofilm production may be proportional to the increase in antibiotic resistance. However, this possibility should be verified with more assays evaluating the biofilm structure and composition.

Planktonic cells were highly resistant to erythromycin, trimethoprim, oxacillin, and ciprofloxacin. Methicillin resistance and *mecA* gene frequency were also high (85%). Most isolates carried a non-typeable SCC*mec* complex, with a high percentage containing both *mec* complex A and *ccrABI*. These results have been previously reported; however, it is important to continue monitoring the SCC*mec* complex in *S. hominis*, which often carries novel SCC*mec* types.[11–13] In this study, we detected a clone of 5 isolates that was strong biofilm producer, and isolates were collected from the paediatric intensive care unit. Several outbreaks of bloodstream infections among neonates and adults have been attributed to *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, which may account for the dissemination of these clones in the hospital environment. Additionally, *S. hominis* colonisation is frequently detected on the hands of nurses with skin lesions.[3, 44]

In conclusion, the *S. hominis* isolates analysed in this study were highly resistant to methicillin and other antimicrobials. Most of the SCC*mec* types detected were different from those described for *S. aureus*. We detected four clones, but in general, the isolates showed low clonality. The results of this study indicate that *S. hominis* is strong biofilm producer with an

extracellular matrix with similar composition of proteins, DNA and *N*-acetylglucosamine. In addition, this species presents a high frequency of *icaD* gene and low expression of *icaD*. The biofilm production level is associated with antibiotic resistance.

Supporting Information

S1 Table. Characteristics and Results.

(XLS)

Acknowledgments

We wish to thank the staff at the Bacteriology Laboratory of the Hospitals Universitario Dr. José E González and Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde, who helped to recover the isolates used in this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SMO EGG. Performed the experiments: SMO EGG JLD ACO NCV. Analyzed the data: SMO EGG RMO LVT ACO NCV. Contributed reagents/materials/analysis tools: SMO EGG RMO ERN JLD. Wrote the paper: SMO EGG RMO LVT ERN ACO GMG.

References

1. Al Wohoush I, Rivera J, Cairo J, Hachem R, Raad I. Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(4):569–71. doi: [10.1111/j.1469-0691.2010.03372.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03372.x) PMID: [20854425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20854425/)
2. Chaves F, Garcia-Alvarez M, Sanz F, Alba C, Otero JR. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(9):4877–9. PMID: [16145165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16145165/)
3. d'Azevedo PA, Trancesi R, Sales T, Monteiro J, Gales AC, Pignatari AC. Outbreak of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* bloodstream infections in Sao Paulo city, Brazil. *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 2):256–7. doi: [10.1099/jmm.0.47345-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.47345-0) PMID: [18201999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18201999/)
4. Palazzo IC, d'Azevedo PA, Secchi C, Pignatari AC, Darini AL. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(6):1222–6. doi: [10.1093/jac/dkn375](https://doi.org/10.1093/jac/dkn375) PMID: [18775890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18775890/)
5. Sunbul M, Demirag MK, Yilmaz O, Yilmaz H, Ozturk R, Leblebicioglu H. Pacemaker lead endocarditis caused by *Staphylococcus hominis*. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2006; 29(5):543–5. PMID: [16689853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16689853/)
6. Cunha BA, Esrick MD, Larusso M. *Staphylococcus hominis* native mitral valve bacterial endocarditis (SBE) in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Heart Lung*. 2007; 36(5):380–2. PMID: [17845885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17845885/)
7. Sychev YV, Vemulakonda GA. Chronic *Staphylococcus hominis* endophthalmitis following injury with a retained intraocular foreign body. *Eye (Lond)*. 2014; 28(12):1517.
8. Chamon RC, Iorio NL, Cavalcante FS, da Silva Teodoro CR, de Oliveira AP, Maia F, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*: single and double mutations at the domain V of 23S rRNA among isolates from a Rio de Janeiro hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 80(4):307–10. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.011](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.011) PMID: [25294302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25294302/)
9. de Almeida LM, de Araujo MR, Sacramento AG, Pavez M, de Souza AG, Rodrigues F, et al. Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(8):4082–3. doi: [10.1128/AAC.00437-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00437-13) PMID: [23689714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23689714/)
10. Won JY, Kim M. Vancomycin-resistant *Staphylococcus hominis* endophthalmitis following cataract surgery. *Clin Ophthalmol*. 2013; 7:1193–5. doi: [10.2147/OPTH.S46792](https://doi.org/10.2147/OPTH.S46792) PMID: [23818754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23818754/)
11. Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H, Miragaia M. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements. *PLoS One*. 2011; 6(7):e21940. doi: [10.1371/journal.pone.0021940](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021940) PMID: [21760926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21760926/)

12. Zhang L, Thomas JC, Miragaia M, Bouchami O, Chaves F, d'Azevedo PA, et al. Multilocus sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, *Staphylococcus hominis*. PLoS One. 2013; 8(6):e66496. doi: [10.1371/journal.pone.0066496](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066496) PMID: [23776678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23776678/)
13. Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Llaca-Díaz J, Flores-Trevino S, González-González GM, et al. Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. PLoS One. 2013; 8(4):e61161. doi: [10.1371/journal.pone.0061161](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061161) PMID: [23585877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23585877/)
14. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(6):1549–55. PMID: [10817707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10817707/)
15. Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Llaca-Díaz JM, Rodríguez-Noriega E. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. Epidemiol Infect. 2010; 138(5):645–54. doi: [10.1017/S0950268809991361](https://doi.org/10.1017/S0950268809991361) PMID: [19961645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19961645/)
16. Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol. 2009; 47(4):1172–80. doi: [10.1128/JCM.01891-08](https://doi.org/10.1128/JCM.01891-08) PMID: [19144798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19144798/)
17. de Allori MC, Jure MA, Romero C, de Castillo ME. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. Biol Pharm Bull. 2006; 29(8):1592–6. PMID: [16880610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880610/)
18. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985; 22(6):996–1006. PMID: [3905855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3905855/)
19. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2(2):114–22. PMID: [12563302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12563302/)
20. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(4):322–32. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011) PMID: [20149602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20149602/)
21. Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM, Deighton MA. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9:16. doi: [10.1186/1476-0711-9-16](https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-16) PMID: [20504376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20504376/)
22. Szczuka E, Telega K, Kaznowski A. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. Folia Microbiol (Praha). 2015; 60(1):1–5.
23. Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2005; 43(5):2286–90. PMID: [15872257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15872257/)
24. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005; 43(10):5026–33. PMID: [16207957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16207957/)
25. CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Five Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA, USA, 2015.
26. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(1):264–74. PMID: [17043114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17043114/)
27. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(10):3457–9. PMID: [17005831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17005831/)
28. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol. 2003; 41(4):1574–85. PMID: [12682148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12682148/)
29. Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, Serruys E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1992; 30(10):2599–605. PMID: [1328279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1328279/)
30. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33(9):2233–9. PMID: [7494007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7494007/)

31. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24(9):817–22. PMID: [16148849](#)
32. Deighton M, Borland R. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun*. 1993; 61(10):4473–9. PMID: [8406839](#)
33. Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(3):888–95. PMID: [17158933](#)
34. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 75(2):408–13. PMID: [16088896](#)
35. Cui B, Smooker PM, Rouch DA, Deighton MA. Effects of erythromycin on the phenotypic and genotypic biofilm expression in two clinical *Staphylococcus capitis* subspecies and a functional analysis of *ica* proteins in *S. capitis*. *J Med Microbiol*. 2015; 64(6):591–604. doi: [10.1099/jmm.0.000059](#) PMID: [25813821](#)
36. Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A, et al. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods Enzymol*. 2001; 337:377–85. PMID: [11398443](#)
37. Ruiz de Gopegui E, Iuliana Marinescu C, Diaz P, Socias A, Garau M, Ayestaran JI, et al. [Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(5):339–44. doi: [10.1016/j.eimc.2011.02.001](#) PMID: [21435748](#)
38. Szczuka E, Trawczynski K, Kaznowski A. Clonal analysis of *Staphylococcus hominis* strains isolated from hospitalized patients. *Pol J Microbiol*. 2014; 63(3):349–54. PMID: [25546946](#)
39. Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, et al. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 1):83–93. PMID: [17172522](#)
40. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4):1973–6. PMID: [15815035](#)
41. Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun*. 2007; 75(10):4728–42. PMID: [17635864](#)
42. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*. 2004; 279(52):54881–6. PMID: [15501828](#)
43. Garza-Gonz Lez E, Morfin-Otero R, Mart Nez VZMA, Gonzalez-Diaz E, Gonz Lez-Santiago O, Rodr Guez-Noriega E. Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus sciuri*. *Scand J Infect Dis*. 2011; 43(11–12):930–6. doi: [10.3109/00365548.2011.598873](#) PMID: [21851333](#)
44. Larson EL, Hughes CA, Pyrek JD, Sparks SM, Cagatay EU, Bartkus JM. Changes in bacterial flora associated with skin damage on hands of health care personnel. *Am J Infect Control*. 1998; 26(5):513–21. PMID: [9795681](#)

Standards in Genomic Sciences

Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of *Staphylococcus cohnii* isolated from human patients --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	SIGS-D-15-00107R1
Full Title:	Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of <i>Staphylococcus cohnii</i> isolated from human patients
Article Type:	Short genome report
Funding Information:	
Abstract:	<p>Herein, we report the draft-genome sequences and annotation of two opportunistic pathogenic strains of <i>Staphylococcus cohnii</i> from human isolates. One strain (SC-57) was isolated from blood from a male patient in May 2006 and the other (SC-532) from a catheter from a male patient in June 2006.</p> <p>Similar to other genomes, most genes (42%) of both strains are involved in metabolism of amino acids and derivatives, carbohydrates and proteins. Eighty (4%) genes are involved in virulence, disease, and defense and both species show phenotypic low biofilm production and evidence of increased antibiotic resistance associated to biofilm production.</p> <p>From both isolates, a new SCCmec was detected: (mec class A, ccr type 1). This is the first report of whole genome sequences of opportunistic <i>S. cohnii</i> isolated from human patients.</p>
Corresponding Author:	Elvira Garza-Gonzalez Universidad Autonoma de Nuevo Leon Monterrey, Nuevo León MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma de Nuevo Leon
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Soraya Mendoza-Olazarán
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	<p>Soraya Mendoza-Olazarán</p> <p>José F Garcia-Mazcorro</p> <p>Rayo Morfín-Otero</p> <p>Licet Villarreal-Treviño</p> <p>Adrián Camacho-Ortiz</p> <p>Eduardo Rodríguez-Noriega</p> <p>Jorge Llaca-Díaz</p> <p>Néstor Casillas-Vega</p> <p>Héctor J Maldonado-Garza</p> <p>Scot E Dowd</p> <p>Elvira Garza-Gonzalez</p>
Order of Authors Secondary Information:	
Response to Reviewers:	Dr. Lynn Schriml Editor Standards in Genomic Sciences

Thank you for your careful review of our short genome report entitled "Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of *Staphylococcus cohnii* isolated from human patients" with the manuscript number SIGS-D-15-00107. We have considered the reviewer' comments and respond as follows:

Reviewer #1:

(1) URLs should be included as references, and removed from the text, e.g.on Page 7: <http://www.hiv.lanl.gov/>. SIGS Instructions to Authors: <http://www.standardsingenomics.com/authors/instructions/shortgenomereport>. All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list. rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database: <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Response: All web links and URLs were removed from the manuscript text and were included in the reference list.

(2) Abbreviations should be added, following "Keywords" Instructions: Authors should include any non-standard abbreviations that are used throughout the article. Do not include well-known abbreviations (e.g., NCBI, EMBL, DNA, RNA) and do not use non-standard abbreviations for organism names. Species and subspecies names must be fully spelled out on first use as binomials (genus name and species epithet) or trinomials (genus name, species epithet subsp. subspecies epithet). Following first usage, the genus name may be abbreviated by using the first letter of the genus name, followed by a period and the epithets.

Response: The following abbreviations were included in the manuscript text after the conclusions: SCCmec, Staphylococcal Cassette Chromosome mec; OD, optical density; MBEC, Minimum Biofilm Eradication Concentration.

(3). Page 8, line 14, replace: obtained by Grice et al. with a reference & on line 25 In this sentence: These sequences were originally obtained by Grice et al. from antecubital fossa (inner elbow) skin from the right (67 sequences) and left arms (124 sequences) of one healthy human.

Response: In the lines 14 and 25 of page 8, the text: "Grice et al." was replaced with a reference.

(4) typo, Page 8, line 41
The draf genomes --> should be draft

Response: This typo was corrected.

(5) Page 10, capitalize "Figure", line 45 (figures 5 and 6.)

Response: The word "figures" from page 10 (line 45) was capitalized.

(6) Table 1: MIGS-5, the dates should be written as: May 23, 2006 and June 8, 2006. MIGS-4.1 & MIGS-4.2, should be decimals. MIGS-4.4: should be m for meters. Table 2: GenBank date of Release (uppercase the B in GenBank) date format: April 15, 2015. This table is lacking lines (as seen in Tables 1 & 3), and the font size is larger in this table, than the other tables.

Response: In Table 1, the format of the dates in the MIGS-5 was changed, the MIGS-

4.1 and MIGS-4.2 were replaced by decimals values and the MIGS-4.4 the word meters was substituted by m. In Table 2, the letter B of word Genbank was written with uppercase, the date format was corrected, the lack line was added, and the font size was changed to size 10.

(7) Tables 8 & 9, if they cannot be shortened, they should be added as Supplementary Tables.

Response: The tables 8 and 9 were removed from the manuscript and were added as additional file 1 and additional file, respectively.

We thank the editor and reviewers for their comments in this review and hope that the responses and modifications help clarify the manuscript. We believe that the manuscript has been strengthened as a result of this process.

Thanks in advance for considering this work.

Sincerely,
Elvira Garza-González

[Click here to view linked References](#)

Short Genome Reports

Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of *Staphylococcus cohnii* isolated from human patients

Soraya Mendoza-Olazarán¹, José F Garcia-Mazcorro², Rayo Morfín-Otero³, Licet Villarreal-Treviño⁴, Adrián Camacho-Ortiz⁵, Eduardo Rodríguez-Noriega³, Jorge Llac-Díaz⁶, Néstor Casillas-Vega¹, Héctor J Maldonado-Garza¹, Scot E Dowd⁷, Elvira Garza-González^{1,6*}.

1. Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León, México.
2. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad, Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León, México
3. Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde, and Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco México.
4. Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León, México.
5. Servicio de Infectología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León, México.
6. Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León, México.

1
2
3
4 7. Molecular Research DNA Laboratory, Shallowater, Texas, United States of
5
6
7 America.

8
9
10
11 Corresponding author:

12
13
14 Elvira Garza-González

15
16
17
18 Avenida Francisco I. Madero s/n, Colonia Mitras Centro

19
20
21 Monterrey, NL. 64460. México.

22
23
24
25 Phone and Fax: +52 83 333664

26
27
28 E-mail: elvira_garza_gzz@yahoo.com
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Abstract**
5

6
7 Herein, we report the draft-genome sequences and annotation of two opportunistic pathogenic
8
9 strains of *Staphylococcus cohnii* from human isolates. One strain (SC-57) was isolated from blood
10
11 from a male patient in May 2006 and the other (SC-532) from a catheter from a male patient in June
12
13 2006.
14

15
16 Similar to other genomes, most genes (42%) of both strains are involved in metabolism of amino
17
18 acids and derivatives, carbohydrates and proteins. Eighty (4%) genes are involved in virulence,
19
20 disease, and defense and both species show phenotypic low biofilm production and evidence of
21
22 increased antibiotic resistance associated to biofilm production.
23

24
25 From both isolates, a new SCC*mec* was detected: (*mec* class A, *ccr* type 1).
26

27
28 This is the first report of whole genome sequences of opportunistic *S. cohnii* isolated from human
29
30 patients.
31

32
33
34
35 **Keywords:** SCC*mec*, *Staphylococcus cohnii*, Coagulase-negative staphylococci, genome
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are opportunistic pathogens in humans and other animal species. Some of these species are normal microbiota of human skin and mucous membranes and are frequently detected as contaminants of microbiological cultures [1, 2]. The increasing frequency of CoNS as opportunistic pathogens has been attributed in part to the use of medical devices, such as intravascular catheters and prostheses [3]. This has been related to the production of biofilm by some CoNS species since biofilm allows the adherence of bacteria to plastic medical devices. The biofilm may protect bacteria against immunological host defense mechanisms and antimicrobial therapy [4]. The formation of biofilm has been associated with the presence of the *ica* operon that encodes for the expression of a polysaccharide intercellular adhesin (PIA). This operon has been studied mainly in *Staphylococcus epidermidis* [5].

Staphylococcus cohnii is part of the CoNS group and has been isolated from human and non-human primates [6]. Increasing evidence suggests that is an important opportunistic pathogen for humans [7, 8]. There is only one published draft genome sequence of one strain of *S. cohnii* isolated from a hospital environment in China but none has been described from human sources [9]. Here, we report the draft-genome sequences and annotation of two opportunistic strains of *S. cohnii* isolated from human patients. One strain was isolated from blood from a male patient in May 2006 and the other from a catheter in June 2006.

Organism information

Classification and features

S. cohnii strains SC-57 and SC-532 were classified as causative agents of bacteremia and catheter-related blood stream infection, respectively. Strains were recovered from patients in a tertiary hospital in Monterrey, Mexico. For isolate SC-57 a blood culture bottle was incubated using the Versatrek system (Oakwood Village, Ohio). Subculture of the bottle was performed on 5% blood agar, and the plate was incubated at 35°C for 24-48 h. The SC-532 isolate was cultured from a catheter tip using the Maki method [10]. The Gram reaction of cells of strains SC-57 and SC-532 was determined with air-dried smears of liquid cultures that were fixed with methanol and Gram stained with DIFCO kit reagents. For light microscopy, cells were observed with a Zeiss Axio Imager A1 (Jena, Germany) microscope. Cells stained Gram-positive and had a spherical shape in exponential growth phase (Figure 1). Classification and general features of isolates SC-57 and SC-532 **in accordance with** minimum information about genome sequence (MIGS) specifications [11] are shown in Table 1.

Biofilm production, and typing of the *ica* operon

The biofilm production of each strain was investigated by the Christensen method [12, 13] with the modifications suggested for the normalization approaches that compensate for differences in growth rate. All isolates were tested in quadruplicate in two different experiments conducted on different days. Isolates with an $OD \geq 0.25$ were considered strong biofilm producers, whereas isolates with an OD between 0.15 and 0.24 were regarded weak biofilm producers. For quantitative analysis, the biofilm index was determined, data for each experiment were analyzed by dividing the mean biofilm OD_{570} measurement (three wells per isolate) by the total cells OD_{600} measurement (biofilm index = total cells OD_{600} / biofilm density OD_{570}). *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

1
2
3
4 (biofilm producer) and *S. hominis* ATCC 27844 (biofilm non-producer) were used as control
5
6 organisms.

7
8
9 DNA was obtained by phenol-chloroform extraction. Genes in the *ica* operon (*icaA*, *icaD*, *icaB*,
10
11 *icaC* and *icaR*) were detected by multiplex PCR as described previously [14].

12
13
14 Both isolates were biofilm producers and were classified as weak biofilm producers (Table 5). None
15
16 of the isolates amplified for the *ica* genes.

17 18 19 20 **Antibiotic susceptibility of planktonic cells and Minimum Biofilm Eradication Concentration** 21 22 **(MBEC)**

23
24
25
26 Antibiotic susceptibility of planktonic cells was performed using the broth microdilution method as
27
28 recommended by the CLSI [15]. The antibiotics tested were erythromycin, trimethoprim, amikacin,
29
30 vancomycin, linezolid, oxacillin, ciprofloxacin and chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Toluca,
31
32 Mexico). Isolate 57 was resistant to oxacillin, ciprofloxacin, amikacin, trimethoprim and
33
34 chloramphenicol. Isolate 532 was resistant to oxacillin, amikacin, and trimethoprim. Minimum
35
36 inhibitory concentration values obtained for each antibiotic are shown in Table 6.

37
38
39
40 The Minimum Biofilm Eradication Concentration was performed by the method reported by Ceri, H
41
42 *et al.* [16]. Bacterial biofilms were grown in polystyrene pegs; the Calgary Biofilm Device (CBD)
43
44 utilized a microtiter plate (the MBEC™-Physiology and Genetics assay) as well as the manufacturer
45
46 (Innovotech, Edmonton, AB, Canada). The MBEC increased significantly for amikacin and
47
48 erythromycin for both isolates and for vancomycin and linezolid for isolate SC-532.
49
50

Methicillin resistance and SCCmec typing

Methicillin resistance was determined by the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [15] and *mecA* was detected by PCR [17, 15]. A standard methicillin-sensitive *S. aureus* strain (*S. aureus* ATCC 43300) and methicillin-resistant *S. aureus* strain (*S. aureus* ATCC 25923) were used as quality control organisms.

Typing of the elements of the SCCmec, *ccr*, *mec* class was performed as previously described by Zhang *et al.* [17] and Kondo *et al.* [18]; *ccrAB4* typing was performed using the method described by Oliveira *et al.* [19] with modifications proposed by Zhang *et al.* [20]. All SCCmec typing experiments were performed in duplicate. Both isolates were methicillin resistant and amplified for *mecA*. From both isolates, a new SCCmec was detected: (*mec* class A, *ccr* type 1) (Table 5).

16S rRNA gene analysis

All 16S rRNA sequences found in our strains were 100% similar; therefore, we only used one sequence for phylogenetic analysis. Figure 2 show a rectangular cladogram of our representative 16S rRNA sequence along all sequences in Hu *et al.* [9], including their published *S. cohnii* subsp. *cohnii* strain hu-01. Briefly, the FindModel tool available at the HIV Molecular Immunology Database [21] was used to find the best model of nucleotide substitution (General Time Reversible or GTR plus Gamma was selected based on the Akaike information criterion, initial tree constructed using Weighbor). Sequences were aligned using Clustal W2 [22] and uploaded in DAMBE [23] to build a phylogenetic tree using a Maximum Likelihood method. Our results indicate an identical tree topology compared to the one in Hu *et al.* [9], with our sequence being more closely related to *S. cohnii* subsp. *urealyticus* [24] (Figure 2).

We additionally investigated the relationship between our *Staphylococcus* strains and human skin *Staphylococcus*. A total of 191 16S rRNA sequences from a study published by Grice *et al.* [1] were

1
2
3
4 downloaded from the Ribosomal Database Project [25]. This study found *Staphylococcus* in only
5
6 one out of five healthy subjects and presumed that this one subject was subclinically colonized with
7
8 this genus. These sequences were originally obtained from antecubital fossa (inner elbow) skin from
9
10 the right (67 sequences) and left arms (124 sequences) of one healthy human [1]. The sequences
11
12 were processed as described above along with our 16S rRNA sequence in addition to *S. cohnii*
13
14 subsp. *cohnii* strain hu-01 [9] and *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (AB009936) [24]. This analysis
15
16 showed a distinctive cluster of our sequence, strain hu-01, and *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (as
17
18 shown above) that is separated (100% bootstrap support) from all other human skin *Staphylococcus*
19
20 previously reported [1] with the exception of a cluster composed of only 4 sequences (in RDP:
21
22 S001025337, S001025363, S001025362, S001025422) obtained from the right arm (results not
23
24 shown).
25
26
27
28
29
30
31

32 **Genome sequencing information**

33 **Genome project history**

34
35
36 The two genomes were selected for sequencing on the basis of their clinical relevance and isolation
37
38 source. Sequencing and annotation were performed at the Molecular Research DNA Laboratory,
39
40 Shallowater, Texas, United States of America. The draft genomes sequences were completed on
41
42 November 21, 2014. The genomes project are deposited in the Genomes OnLine Database
43
44 (GOLD) as projects [Gp0119449](#) (SC-57) and [Gp0119481](#) (SC-532). This Whole Genome Shotgun
45
46 project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accessions [LATU00000000](#) (SC-
47
48 57) and [LATV00000000](#) (SC-532). The versions described in this paper are versions
49
50 LATU01000000 and LATV01000000, respectively. The project information and its association
51
52 with MIGS version 2.0 compliance are presented in Table 2 [11].
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Growth conditions and genomic DNA preparation

Both isolates were cultured onto 5% blood agar, and the plates were incubated at 35°C for 24-48 h.

CoNS were determined based on colony morphology, Gram staining, positive catalase test, and a negative tube coagulase. The strains were identified to the species level using the API Staph kit (bioMérieux, France) according to manufacturer instructions.

On API galleries, both isolates were positive for acidification glucose, fructose, mannose, maltose, lactose, trehalose and N-acetyl-glucosamine, production of N-acetyl-methyl-carbinol (Voges-Proskauer) and urease. Isolates were negative for acidification xylitol, melibiose, raffinose, xylose, saccharose, methyl- α D-glucopyranoside, reduction of nitrates to nitrites and arginine dihydrolase.

Species identification was confirmed by partial sequencing of the 16S rRNA gene [26]. Sequencing was performed at the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. DNA sequences were compared to genes in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank using the BLAST algorithm [27]. For genome sequencing, genomic DNA was obtained using a commercial DNA extraction kit. The concentration and purity of DNA was measured in a Spectrophotometer Beckman DU 640 (Minnesota, USA). Pure DNA was sent to Molecular Research LP (Shallowater, TX, USA).

Genome sequencing and assembly

Deep sequencing was carried out using MiSeq 2x250 bp sequencing [28]. DNA libraries were prepared using Nextera DNA sample prep kits to create individual barcode indices. At least 0.8 gigabases of nucleotide sequences were generated.

Genome annotation

The generated data was analyzed using MG-RAST metagenome analysis server [29] using both assembled and unassembled data. An evidence-based annotation approach was used for annotation

1
2
3
4 of metagenomic sequences [30, 31]. Sequences were using BlastX against protein databases with an
5
6 E-value cutoff of 1×10^{-5} . Predicted genes were classified and tabulated into functional categories
7
8 from lower (individual genes) to higher (cellular processes) orders. The draft genomes were
9
10 annotated using the standard operation procedure of the Integrated Microbial Genomes Expert
11
12 Review (IMG-ER) platform developed by the Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA, USA
13
14 [32]. For the prediction of signal peptides and transmembrane domains, SignalP 4.1 Server [33, 34]
15
16 and TMHMM Server v. 2.0 [35] were used, respectively. Assignment of genes to the COG
17
18 database [36, 37] and Pfam domains [38] was performed with WebMGA server [39]. CRISPR
19
20 regions were identified with CRISPRFinder [40, 41]
21
22
23
24
25
26
27

28 **Genome properties**

29
30
31

32 The SC-57 draft genome contains 2,370,303 bp. The reads were assembled into 20 contigs with 76
33
34 RNAs and 2,724 CDSs. The SC-532 draft genome contains 2,353,590 bp. The reads were
35
36 assembled into 16 contigs with 74 RNAs and 2,714 CDSs (Table 3). The distribution of genes into
37
38 COG functional categories is presented in Table 4. Subsystem information of strains is shown in
39
40 Figures 3 and 4.
41
42
43

44 Similarly to other genomes, most genes (42%) of both strains are involved in metabolism of amino
45
46 acids and derivatives, carbohydrates, and proteins. Eighty genes (4%) are involved in virulence,
47
48 disease, and defense. Metabolic pathways of strains are shown in Figures 5 and 6.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Insights from the genome sequence

There are 2032 features in common to both strains. On the other hand, there are 5 features that were present in strain SC-57 but absent in strain SC-532. One topoisomerase (replication initiation protein), two related to sucrose metabolism (one sucrose operon repressor and one sucrose permease), one threonine dehydrogenase, and one L-alanyl-gamma-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase. These differences were not enough to change the scenarios (representation of components of a metabolic reaction network; for example, aspartate to diaminoheptanedioate in the KEGG map of lysine biosynthesis) for both strains. In other words, all scenarios were the same for both strains (information not shown).

Biofilm and resistance genes detected

For both isolates, the gene for *icaC* for PIA biosynthesis was detected, which may be involved in the low biofilm production. As described before, none of the isolates amplified for the *ica* genes, but this PCR was designed for PIA of *S. epidermidis*.

Putative genes for resistance to teicoplanin, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactamase as well as genes for copper, cobalt, mercury, cadmium, chromium, and arsenic resistance were detected (Table 7).

As shown in resistance results, both isolates were resistant to the aminoglycoside amikacin, which may be explained by the presence of [aminoglycoside adenyltransferases](#). Additionally, isolate SC-57 was resistant to ciprofloxacin, which may be associated to the presence of DNA gyrase subunit A and B and topoisomerase IV subunit A and B, which encode resistance to fluoroquinolones. Furthermore, genes encoding BceA, BceR and BceS were detected. These are related to bacitracin resistance. In *Bacillus subtilis*, confers resistance to bacitracin, mersacidin, and actagardine [42, 43].

Elements of the SCCmec detected

The SCCmec of both isolates had a class A *mec* gene complex composed of methicillin resistance repressor (*mecI*), methicillin resistance regulatory sensor transducer (*mecR1*), penicillin binding protein (PBP2a), and methicillin resistance determinant MecA (all within the same contig);

Furthermore, cassette chromosome recombinase B (*ccrB*) and cassette chromosome recombinase A (*ccrA*) (both within the same contig), and the insertion sequence IS431, were detected.

The nucleotide composition and their place in the genome for both *mecA* and MecR1 are common to other *Staphylococci*. Interestingly, Zong *et al.* presented a new SCCmec element in *S. cohnii* and the complete sequence is publicly available (51,384 bp) [44]. This new SCCmec element also possesses the MecA and MecR1 sequences but also possess in between a short 99 bp-long sequence

(CTGCTACACCTCCATATCACAAAAATTATAACATTATTTTGACA

TAAACACTACATTTGTAATATACTACAAATGTAGTCCTATATAAGGAGGATATTG),

which is absent in our strains. This sequence is also absent in the complete sequence of an SCCmec

genomic island of strain HT20040085 of [Staphylococcus aureus subsp. aureus](#) (GI:696158524)

[45]. However, a BLAST search for this little sequence yielded 100% similarity with *S.*

saprophyticus (AB353724), 99% similarity with *S. fleurettii* (AB546266), and 97% similarity with

many *S. aureus* (these differences with *S. aureus* were due to one transversion <G by T> and two

transitions <C by T>).

Extended insights

Comparison with *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (ATCC 15305) genome

From all genomes available in the SEED Viewer, both of our strains showed high similarity with other *Staphylococcus* spp. but the highest scores were given to *S. saprophyticus* subsp.

1
2
3
4 *saprophyticus* (ATCC 15305). There were 134 and 131 functioning parts (defined by having genes
5
6 for all the functional roles that comprise a variant of a subsystem) that were present in strain SC-57
7
8 and SC-532, respectively, but absent in ATCC 15305 (Additional file 1). On the other hand, there
9
10 were 102 and 103 functioning parts that were present in ATCC 15305 but absent in strain 57 and
11
12 532, respectively (Additional file 2).
13
14

15 16 17 **Conclusions**

18
19
20 A high similarity was detected among the genomes of *S. cohnii* strains SC-57 and SC-532. Most
21
22 genes of both strains were involved with metabolism of amino acids and derivatives, carbohydrates
23
24 and proteins. Eighty genes were involved in virulence, disease and defense. Both strains showed
25
26 phenotypic biofilm production and *icaC* gene for PIA biosynthesis was detected in the two
27
28 genomes. A new SCC*mec* was detected (*mec* class A, *ccr* type 1) for both isolates. We detected
29
30 evidence of increased antibiotic resistance associated with biofilm production. These strains were
31
32 isolated as opportunistic human pathogens. Therefore their genome sequence will provide insight
33
34 into the genetic background of virulence and antibiotic resistance of this species.
35
36
37
38
39

40 41 **Abbreviations**

42
43 SCC*mec*: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, OD: optical density, MBEC: Minimum
44
45 Biofilm Eradication Concentration.
46
47

48 49 **Competing interests**

50
51 The authors declare that they have no competing interests.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Authors' contributions

EGG, JFGM, and RMO, conceived and supervised the study. SMO draft the manuscript and conducted the lab work. SED annotated the genome, worked on genome sequencing and assembly. LVT, ACO, ERN, NCV, JMLLD, and HJMG discussed, analyzed the data and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Sergio Lozano-Rodriguez, M.D. for his review of the manuscript.

Table 1. Classification and general features of *Staphylococcus cohnii* strains SC-57 and SC-532 [11]

MIGS ID	Property	Term	Evidence code ^a
	Classification	Domain <i>Bacteria</i>	TAS [46]
		Phylum <i>Firmicutes</i>	TAS [47]
		Class <i>Bacilli</i>	TAS [47]
		Order <i>Bacillales</i>	TAS [47]
		Family <i>Staphylococcaceae</i>	TAS [48]
		Genus <i>Staphylococcus</i>	TAS [49]
		Species <i>Staphylococcus cohnii</i>	TAS [50]
		Strains: SC-57 (LATU00000000) and SC-532 (LATV00000000)	IDA
	Gram stain	Positive	IDA
	Cell shape	coccus	IDA
	Motility	Nonmotile	IDA
	Sporulation	Nonsporulating	IDA
	Temperature range	15-45°C	IDA
	Optimum temperature	37°C	IDA
	pH range; Optimum	6.5-7.5, 7	IDA
	Carbon source	D-mannitol, fructose, trehalose	IDA
MIGS-6	Habitat	Skin	IDA
MIGS-6.3	Salinity	Tolerates 10% NaCl (w/v)	IDA
MIGS-22	Oxygen requirement	Facultative anaerobic	IDA
MIGS-15	Biotic relationship	Free living	IDA
MIGS-14	Pathogenicity	Opportunistic pathogenic	IDA
MIGS-4	Geographic location	Monterrey, Mexico	IDA
MIGS-5	Sample collection	May 23, 2006 (SC-57), June 8, 2006 (SC-532)	IDA
MIGS-4.1	Latitude	25.6714.	IDA
MIGS-4.2	Longitude	-100.309	IDA
MIGS-4.4	Altitude	534 m	IDA

^a Evidence codes - IDA: Inferred from Direct Assay; TAS: Traceable Author Statement (i.e., a direct report exists in the literature); NAS: Non-traceable Author Statement (i.e., not directly observed for the living, isolated sample, but based on a generally accepted property for the species, or anecdotal evidence). These evidence codes are from the Gene Ontology project [51]

Table 2. Genome sequencing project information.

MIGS ID	Property	SC-57	SC-532
MIGS-31	Finishing quality	High-quality draft	High-quality draft
MIGS-28	Libraries used	2x250 bp	2x250 bp
MIGS-29	Sequencing platforms	MiSeq Illumina	MiSeq Illumina
MIGS-31.2	Fold coverage	>40x (based on 500 bp library)	>40x (based on 500 bp library)
MIGS-30	Assemblers	NGEN-Assembler	NGEN-Assembler
MIGS-32	GenBank ID	LATU00000000	LATV00000000
	GenBank date of Release	April 15, 2015	April 15, 2015
	GOLD ID	Gp0119449	Gp0119481
	BIOPROJECT	PRJNA279286	PRJNA279286
MIGS-13	Source Material Identifier	SAMN03449103	SAMN03449104
	Project relevance	Clinical	Clinical

Table 3. Genome statistics

Attribute	SC-57		SC-532	
	Value	% of Total	Value	% of Total
Genome size (bp)	2370303	100	2353590	100
DNA coding (bp)	2369466	99.96	2352561	99.96
DNA G+C (bp)	790685	33.36	785184	33.36
DNA scaffolds	2652	n/a	2643	n/a
Total genes	2,756	n/a	2640	n/a
Protein coding genes	2650	100	2640	100.0
RNA genes	76	2.76	74	2.79
Pseudo genes	37	1.34	37	1.39
Genes in internal clusters	232	8.75	211	7.99
Genes with function prediction	2256	85.13	2155	81.63
Genes assigned to COGs	1999	75.43	1982	75.08
Genes with Pfam domains	2284	86.19	2263	85.72
Genes with signal peptides	61	2.30	61	2.31
Genes with transmembrane helices	668	25.21	673	25.49
CRISPR repeats	1	n/a	1	n/a

Table 4. Number of genes associated with general COG functional categories.

Code	SC-57		SC-532		Description
	Value	% age	Value	% age	
J	198	8.92	199	9.05	Translation, ribosomal structure and biogenesis
A	82	3.69	81	3.69	RNA processing and modification
K	153	6.89	151	6.87	Transcription
L	102	4.59	100	4.55	Replication, recombination and repair
B	1	0.05	1	0.05	Chromatin structure and dynamics
D	27	1.22	27	1.23	Cell cycle control, Cell division, chromosome partitioning
V	48	2.16	43	1.96	Defense mechanisms
T	67	3.02	67	3.05	Signal transduction mechanisms
M	101	4.55	101	4.6	Cell wall/membrane biogenesis
N	4	0.18	4	0.18	Cell motility
U	14	0.63	14	0.64	Intracellular trafficking and secretion
O	82	3.69	81	3.69	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
C	117	5.27	117	5.32	Energy production and conversion
G	170	7.66	168	7.64	Carbohydrate transport and metabolism
E	206	9.28	205	9.33	Amino acid transport and metabolism
F	88	3.96	86	3.91	Nucleotide transport and metabolism
H	142	6.4	141	6.41	Coenzyme transport and metabolism
I	99	4.46	98	4.46	Lipid transport and metabolism
P	144	6.49	144	6.55	Inorganic ion transport and metabolism
Q	47	2.12	47	2.14	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	200	9.01	197	8.96	General function prediction only
S	167	7.52	168	7.64	Function unknown
-	651	24.57	658	24.92	Not in COGs

The total is based on the total number of protein-coding genes in the genome.

Table 5. Microbiological and molecular characteristics of our strains.

Isolate N°	Specimen	SCC _{mec} type	Biofilm production	Biofilm index
			Weak	
SC-57	Blood	New (<i>mec</i> class A, <i>ccr</i> type 1)	(OD=0.190)	0.572
SC-532	Catheter	New (<i>mec</i> class A, <i>ccr</i> type 1)	Weak (OD=0.150)	0.515

OD: optical density

Table 6. Minimal inhibitory concentrations obtained for each antibiotic in both biofilm and planktonic cells.

		Minimal inhibitory concentrations (µg/mL)							
Isolate	Cells	OXA	AMI	VAN	ERY	TMP	CIP	TET	LIN
SC-57	Planktonics	8	32	0.25	0.25	64	16	1	1
	Biofilm	16	>128	0.25	>1024	128	32	1	1
SC-532	Planktonics	2	16	0.5	0.25	8	0.5	<0.06	1
	Biofilm	4	64	2	32	8	0.5	0.06	4

ERY: erythromycin; TMP: trimethoprim; AMI: amikacin; VAN: vancomycin; LZD: linezolid; OXA: oxacillin; CIP: ciprofloxacin; CHL: chloramphenicol.

Table 7. Biofilm and resistance to antibiotics and toxic compounds genes detected in both isolates.

Category	Subcategory	Subsystem	Role
Regulation and Cell signaling	Quorum sensing and biofilm formation	Biofilm formation in <i>Staphylococcus</i>	Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) biosynthesis protein IcaC
Virulence, Disease and Defense	Resistance to antibiotics and toxic compounds	Teicoplanin resistance	Teicoplanin resistance associated membrane protein TcaA
			Teicoplanin resistance associated membrane protein TcaB
			Teicoplanin-resistance associated HTH-type transcriptional regulator TcaR
		Aminoglycoside adenylyltransferases	Spectinomycin 9-O-adenylyltransferase
		Fluoroquinolones	DNA gyrase subunit B
		resistance	DNA gyrase subunit A
			Topoisomerase IV subunit B
			Topoisomerase IV subunit A
		Beta-lactamase	Beta-lactamase
			Beta-lactamase repressor BlaI
		Copper homeostasis	Copper-translocating P-type ATPase
			Copper resistance protein D
		Cobalt-zinc-cadmium resistance	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein
			Zn(II) and Co(II) transmembrane diffusion

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

	facilitator
	Transcriptional regulator, MerR family
Mercuric reductase	PF00070 family, FAD-dependent NAD(P)- disulphide oxidoreductase
	Mercuric ion reductase
Mercury resistance operon	Organomercurial lyase
	Mercuric ion reductase
	Mercuric resistance operon regulatory protein
	Membrane component of multidrug resistance system
	TetR family regulatory protein of MDR cluster
Cadmium resistance	Cadmium resistance protein
	Cadmium efflux system accessory protein
	Cadmium-transporting ATPase
Chromium resistance	Chromate transport protein ChrA
	Arsenical-resistance protein ACR3
	Arsenical resistance operon repressor
	Arsenic efflux pump protein

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 2. Rectangular cladogram showing the relationship between 16S rRNA gene sequences of the genus *Staphylococcus*. The names and corresponding accession numbers are shown, including the *S. cohnii* (SC) sequence from this study. The tree is based on the maximum likelihood method with the GTR substitution model, rate heterogeneity among sites modeled by a gamma distribution, and 1000 bootstrap samples. The number at the nodes represents bootstrap support. Generated with DAMBE v. 5.3.74 [23] with the 'Quick add' option on, and the number of branches allowed to cross during tree searching set to 1 for local optimization. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (AB598736) was chosen as the out-group to root the tree.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1. Gram stain of isolates DC-57 (a) and SC -557 (b)

Figure 3. Subsystem information of strain SC-57.

Figure 4 Subsystem information of strain SC-532.

Figure 5. Metabolic pathways of strain SC-532

Figure 6 Metabolic pathways of strain SC-57

References

1. Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome research*. 2008;18(7):1043-50. doi:10.1101/gr.075549.107.
2. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious disease clinics of North America*. 2009;23(1):73-98. doi:10.1016/j.idc.2008.10.001.
3. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*. 1994;7(1):117-40.
4. Kotilainen P. Association of coagulase-negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(12):2779-85.
5. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Molecular microbiology*. 2002;43(6):1367-78.
6. Kloos WE, Wolfshohl JF. Staphylococcus cohnii subspecies: Staphylococcus cohnii subsp. cohnii subsp. nov. and Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum subsp. nov. *International journal of systematic bacteriology*. 1991;41(2):284-9.
7. Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Martinez-Vazquez MA, Gonzalez-Diaz E, Gonzalez-Santiago O, Rodriguez-Noriega E. Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of Staphylococcus cohnii, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus sciuri. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2011;43(11-12):930-6. doi:10.3109/00365548.2011.598873.
8. Soldera J, Nedel WL, Cardoso PR, d'Azevedo PA. Bacteremia due to Staphylococcus cohnii ssp. urealyticus caused by infected pressure ulcer: case report and review of the literature. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2013;131(1):59-61.
9. Hu X, Li A, Lv L, Yuan C, Guo L, Jiang X et al. High quality draft genome sequence of Staphylococcus cohnii subsp. cohnii strain hu-01. *Standards in genomic sciences*. 2014;9(3):755-62. doi:10.4056/sigs.5429581.
10. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England journal of medicine*. 1977;296(23):1305-9. doi:10.1056/NEJM197706092962301.
11. Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nature biotechnology*. 2008;26(5):541-7. doi:10.1038/nbt1360.
12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*. 1985;22(6):996-1006.
13. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(9):817-22. doi:00006454-200509000-00015 [pii].

- 1
2
3
4 14. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L et al. A multiplex
5 PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in *Staphylococcus*
6 *epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *Journal of*
7 *biomedical materials research Part A*. 2005;75(2):408-13. doi:10.1002/jbm.a.30445.
8
9 15. CLSI. M100-S22. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-
10 Second Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
11
12 16. Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A et al. The MBEC Assay System:
13 multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods in*
14 *enzymology*. 2001;337:377-85.
15
16 17. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for
17 characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to
18 V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*.
19 2005;43(10):5026-33. doi:43/10/5026 [pii] 10.1128/JCM.43.10.5026-5033.2005.
20
21 18. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J et al. Combination of multiplex
22 PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for
23 mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother*.
24 2007;51(1):264-74. doi:AAC.00165-06 [pii] 10.1128/AAC.00165-06.
25
26 19. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal
27 cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(10):3457-9.
28 doi:50/10/3457 [pii] 10.1128/AAC.00629-06.
29
30 20. Zhang L, Thomas JC, Miragaia M, Bouchami O, Chaves F, d'Azevedo PA et al. Multilocus
31 sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, *Staphylococcus*
32 *hominis*. *PloS one*. 2013;8(6):e66496. doi:10.1371/journal.pone.0066496.
33
34 21. The HIV Molecular Immunology Database. <http://www.hiv.lanl.gov/>. Accessed January 18,
35 2016.
36
37 22. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive
38 multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and
39 weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 1994;22(22):4673-80.
40
41 23. Xia X. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and
42 evolution. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(7):1720-8. doi:10.1093/molbev/mst064.
43
44 24. Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus
45 *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International journal of systematic*
46 *bacteriology*. 1999;49 Pt 2:725-8.
47
48 25. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ et al. The Ribosomal Database Project:
49 improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*. 2009;37(Database
50 issue):D141-5. doi:10.1093/nar/gkn879.
51
52 26. Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic
53 methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci.
54 *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(5):2286-90. doi:43/5/2286 [pii] 10.1128/JCM.43.5.2286-
55 2290.2005.
56
57 27. The Basic Local Alignment Search Tool. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Accessed
58 January 18, 2016.
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 28. Illumina. <http://www.illumina.com/>. Accessed January 18, 2016.
- 5
6 29. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M et al. The metagenomics
7 RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of
8 metagenomes. *BMC bioinformatics*. 2008;9:386. doi:10.1186/1471-2105-9-386.
- 9
10 30. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA et al. The RAST Server: rapid
11 annotations using subsystems technology. *BMC genomics*. 2008;9:75. doi:10.1186/1471-2164-9-
12 75.
- 13
14 31. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T et al. The SEED and the Rapid
15 Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*.
16 2014;42(Database issue):D206-14. doi:10.1093/nar/gkt1226.
- 17
18 32. Markowitz VM, Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IM, Chu K, Kyrpides NC. IMG ER: a
19 system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics*.
20 2009;25(17):2271-8. doi:10.1093/bioinformatics/btp393.
- 21
22 33. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides
23 from transmembrane regions. *Nature methods*. 2011;8(10):785-6. doi:10.1038/nmeth.1701.
- 24
25 34. Server S. SignalP 4.1 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.
- 26
27 35. TMHMM Server v. 2.0: Prediction of transmembrane helices in proteins.
28 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.
- 29
30 36. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. The COG database: a tool for genome-scale
31 analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research*. 2000;28(1):33-6.
- 32
33 37. COGs - Clusters of Orthologous Groups. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>.
- 34
35 38. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE et al. The Pfam protein families
36 database. *Nucleic acids research*. 2010;38(Database issue):D211-22. doi:10.1093/nar/gkp985.
- 37
38 39. Wu S, Zhu Z, Fu L, Niu B, Li W. WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic
39 sequence analysis. *BMC genomics*. 2011;12:444. doi:10.1186/1471-2164-12-444.
- 40
41 40. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly
42 interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*. 2007;35(Web Server issue):W52-7.
43 doi:10.1093/nar/gkm360.
- 44
45 41. CRISPRfinder program online. <http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php>. Accessed
46 January 18, 2016.
- 47
48 42. Rietkotter E, Hoyer D, Mascher T. Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Molecular*
49 *microbiology*. 2008;68(3):768-85. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06194.x.
- 50
51 43. Staron A, Finkeisen DE, Mascher T. Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of
52 *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):515-25. doi:10.1128/AAC.00352-10.
- 53
54 44. Zong Z, Lu X. Characterization of a new SCCmec element in *Staphylococcus cohnii*. *PloS one*.
55 2010;5(11):e14016. doi:10.1371/journal.pone.0014016.
- 56
57 45. Stegger M, Wirth T, Andersen PS, Skov RL, De Grassi A, Simoes PM et al. Origin and
58 evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*.
59 2014;5(5):e01044-14. doi:10.1128/mBio.01044-14.
- 60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

46. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(12):4576-9.

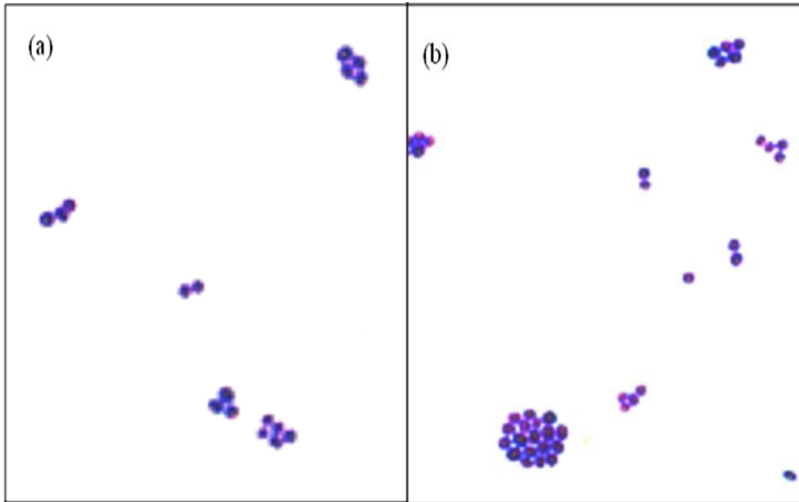
47. Gibbons NE MR. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1978;28:1-6. doi:10.1099/00207713-28-1-1.

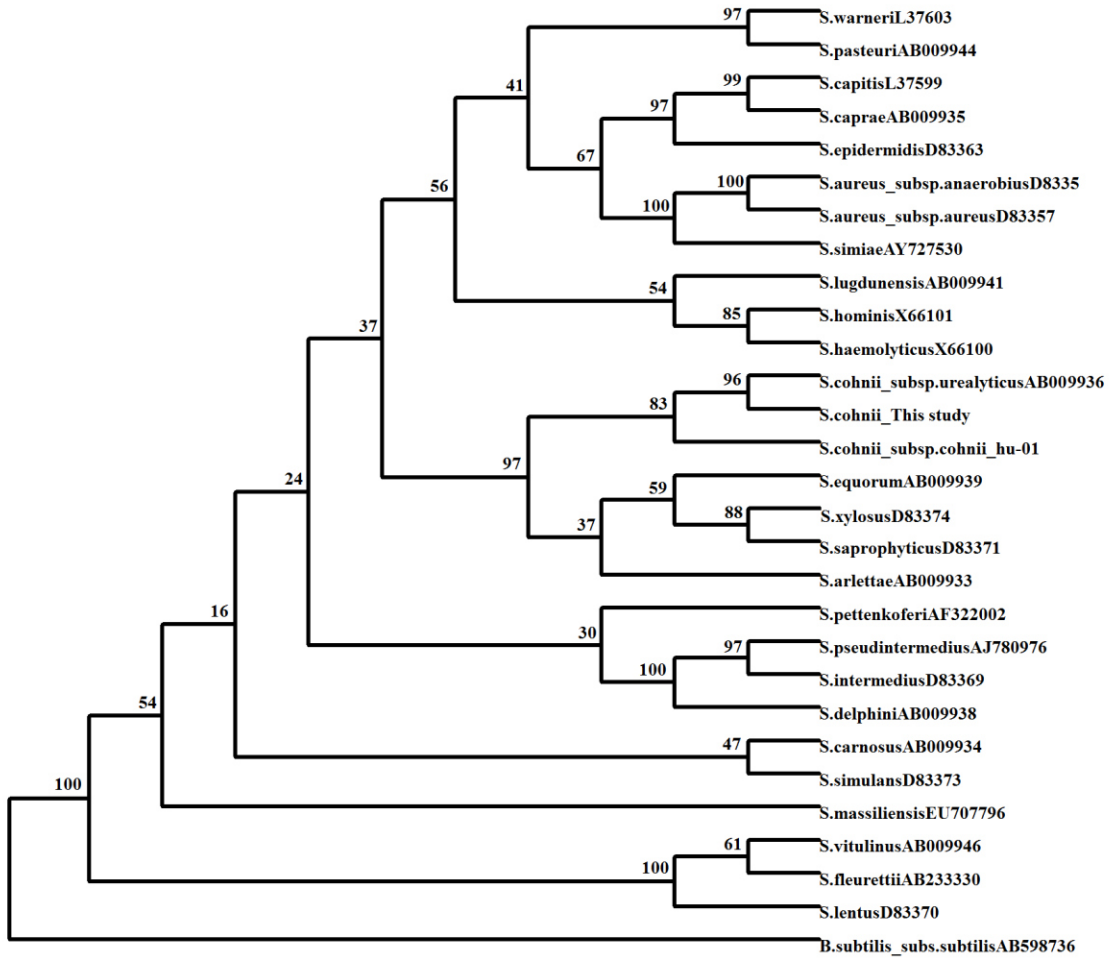
48. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation List no. 132. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010;60:469–72. doi:10.1099/ijms.0.022855-0.

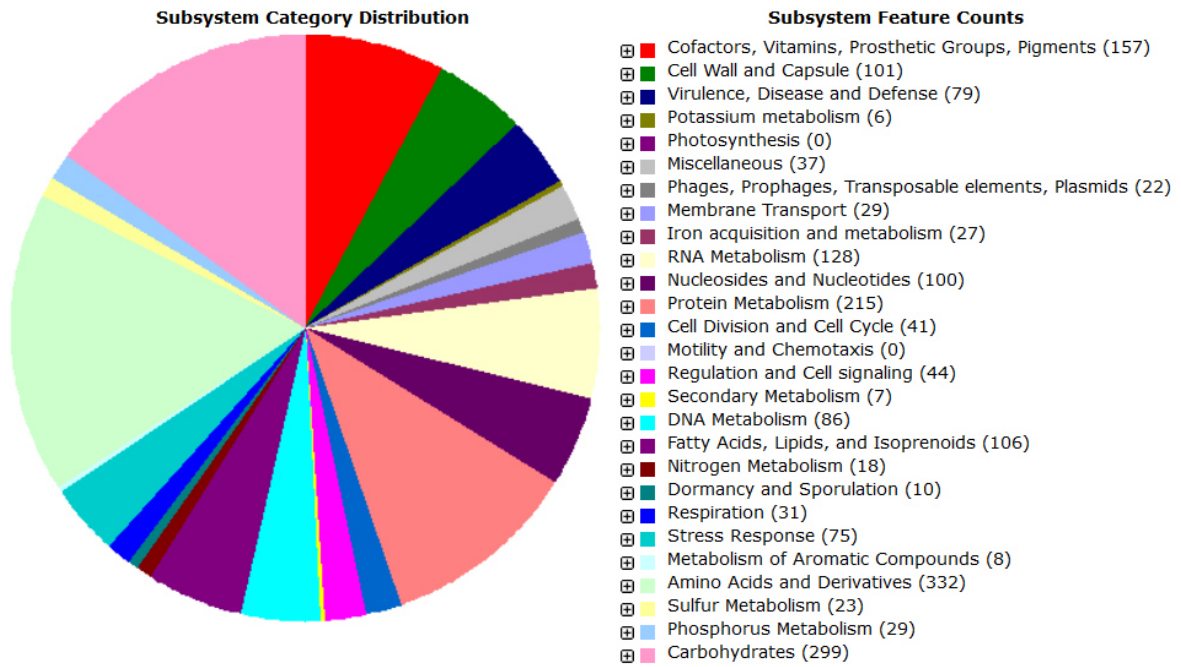
49. 17 JCO. Conservation of the Generic name *Staphylococcus* Rosenbach, Designation of *Staphylococcus aureus* Rosenbach as the Nomenclatural Type of the Genus *Staphylococcus* Rosenbach, and Designation of the Neotype culture of *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*. 1958;8:8:153-4.

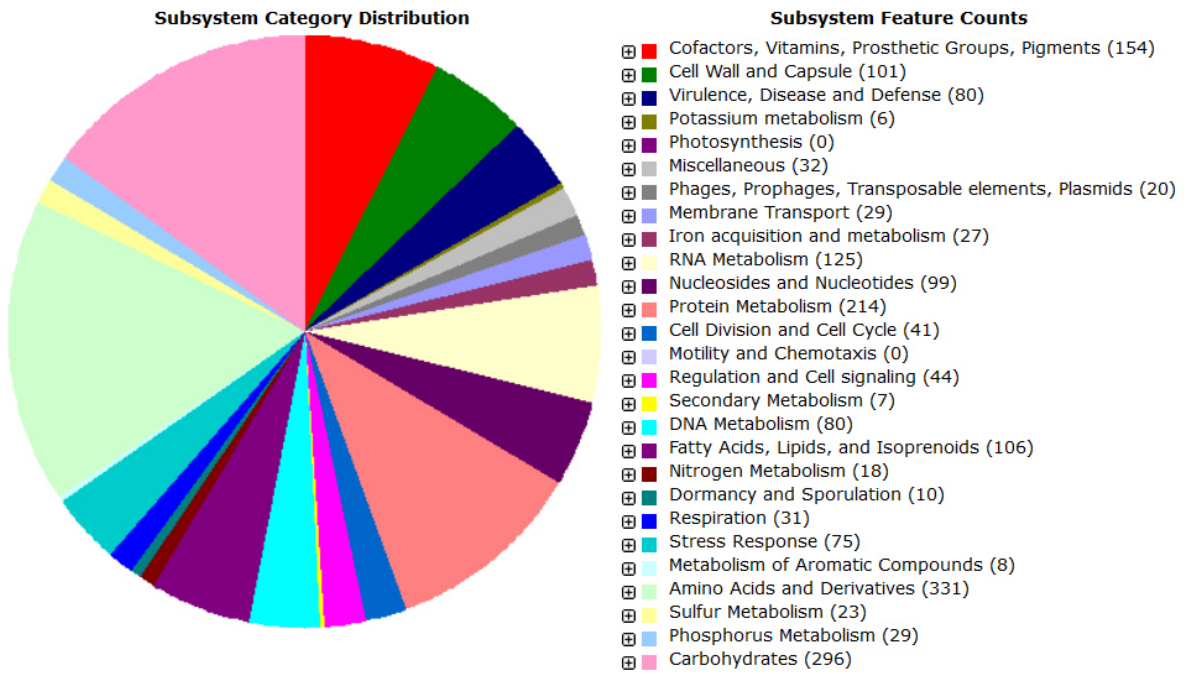
50. Schleifer KH KW. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1975;25:50-61. doi:10.1099/00207713-25-1-50.

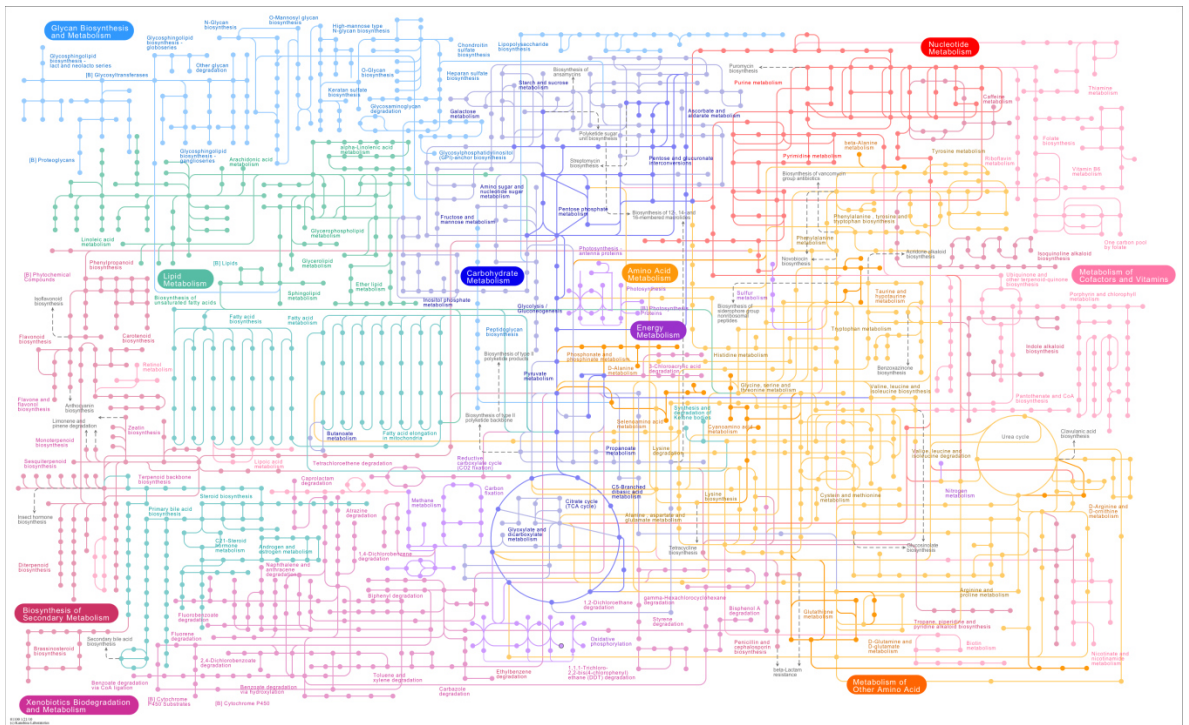
51. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 2000;25(1):25-9. doi:10.1038/75556.

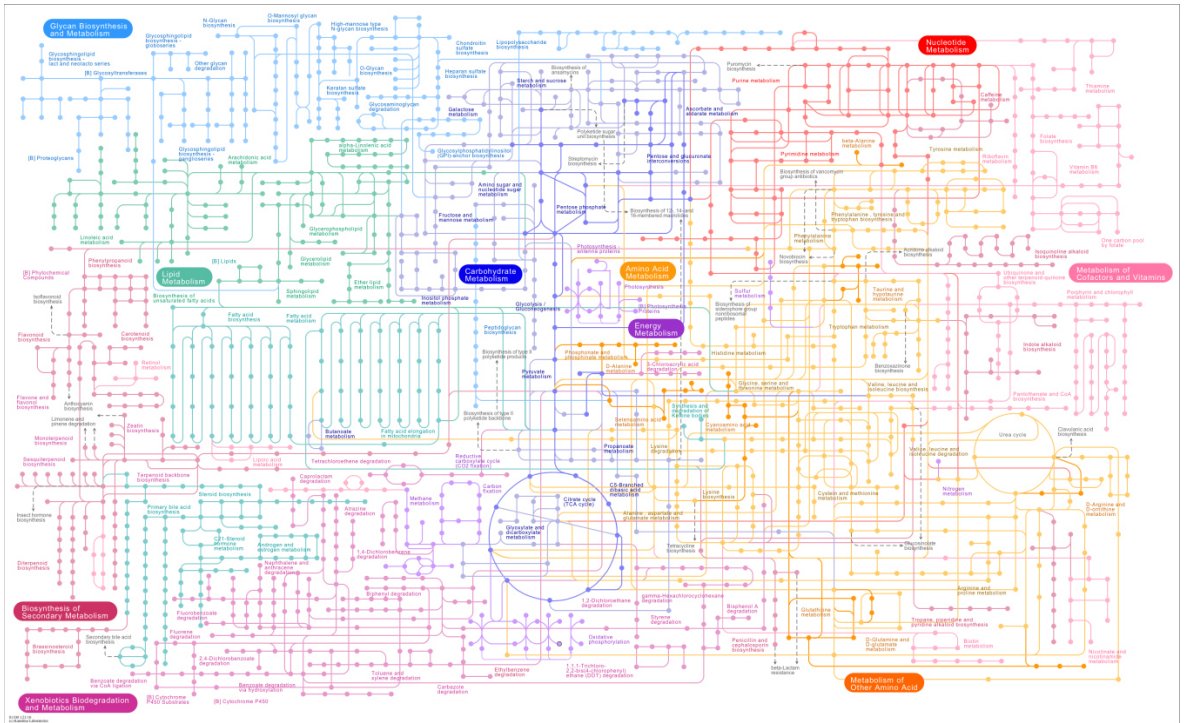












*Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado.
Albert Szent-Györgyi*