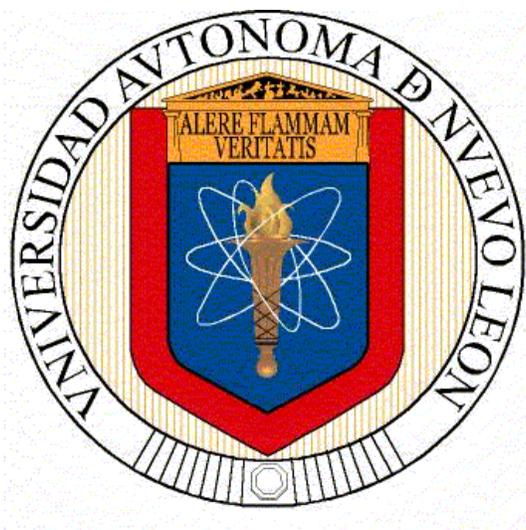


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO
ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*) EN *Staphylococcus*
epidermidis y *Staphylococcus haemolyticus* AISLADOS DE
SANGRE

POR:

JULIO ADRIÁN MARTÍNEZ MELÉNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA

DICIEMBRE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO

ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*)

EN *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*

AISLADOS DE SANGRE

POR:

Q.F.B. JULIO ADRIÁN MARTÍNEZ MELÉNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA

DICIEMBRE, 2014

CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO ESTAFILOCÓCICO *mec*
(SCC*mec*) EN *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* AISLADOS
DE SANGRE.

Aprobación de la Tesis:

Dra. Licet Villarreal Treviño
Director

Dra. Elvira Garza González
Secretario

Dra. Gloria María González González
Vocal 1

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal 2

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal 3

CARACTERIZACIÓN DEL CASETE CROMOSÓMICO ESTAFILOCÓCICO *mec*
(SCC*mec*) EN *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* AISLADOS
DE SANGRE.

Presentado por: Q.F.B. Julio Adrián Martínez Meléndez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas y en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del Servicio de Gastroenterología en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas, al Departamento de Patología Clínica y al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por el apoyo, la confianza y la ayuda que me brindó desde el inicio. Por el tiempo dedicado, así como la paciencia y el compromiso que siempre ha mostrado.

A la Dra. Elvira Garza González, quien siempre estuvo pendiente de mis avances y compartió conmigo sus conocimientos y experiencia; además de su paciencia, tiempo y consejos.

A la Dra. Rayo Morfín y el Dr. Eduardo Noriega por su ayuda y los excelentes momentos que compartieron con nosotros.

A mis padres, por los que siento un gran orgullo y respeto, quienes me han demostrado con su ejemplo, que podemos alcanzar los objetivos trazados a través de la lucha constante y el esfuerzo, con paciencia y dedicación, y quienes en todo momento me han brindado su gran amor y apoyo incondicional. Gracias.

A Flora Cruz López, mi gran amiga, quien siempre me ha demostrado su cariño y aprecio, a través de sus Foia-consejitos, de su tiempo para escucharme y de su PACIENCIA cuando me encontraba desesperado por muchas, muchas cosas. Por los interminables momentos de risa y ocurrencias. Gracias.

A todos en el laboratorio por la ayuda prestada, el apoyo y las enseñanzas: Lucy Acevedo, Carlos Paz, Carlos Esparza, Jessica Gutiérrez y Néstor Casillas. Muy especialmente a Paola Bocanegra, Samantha Flores y Soraya Mendoza, de quienes aprendí muchas cosas, por compartir su tiempo conmigo en el laboratorio, por escucharme y darme sus consejos y apoyo.

Les agradezco a los compañeritos(as): Fabiola, César, Yolis, Diego, Karlita, Hernán, Lety y David por los momentos compartidos durante este trayecto que nos tocó recorrer juntos; por el apoyo y ánimo brindado durante los momentos difíciles.

Además quiero expresar un profundo agradecimiento a todas las personas que no cité anteriormente, pero que contribuyeron de alguna manera u otra para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes son mi ejemplo a seguir y a quienes debo todo.

TABLA DE CONTENIDO

| SECCIÓN | Página |
|--|---------------|
| AGRADECIMIENTOS | III |
| DEDICATORIA | IV |
| LISTA DE TABLAS | VIII |
| LISTA DE FIGURAS | X |
| ABREVIATURAS | XI |
| RESUMEN | XII |
| ABSTRACT | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1. Importancia de los estafilococos coagulasa negativa. | 4 |
| 3.2. Características microbiológicas y hábitat. | 5 |
| 3.3. Identificación de los ECN. | 6 |
| 3.4. Infecciones causadas por <i>S. epidermidis</i> y <i>S. haemolyticus</i> . | 7 |
| 3.5. Factores de virulencia de los ECN. | 8 |
| 3.6. Resistencia a meticilina en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. haemolyticus</i> . | 10 |
| 3.6.1 Mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en cepas resistentes a meticilina. | 11 |
| 3.7. Características generales del SCC <i>mec</i> . | 13 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.7.1 | Complejo de genes <i>mec</i> . | 14 |
| 3.7.2 | Complejo de genes <i>ccr</i> . | 16 |
| 3.7.3 | Regiones de unión (Regiones J). | 17 |
| 3.8. | Tipos de SCC <i>mec</i> . | 17 |
| 4. | HIPÓTESIS | 19 |
| 5. | OBJETIVOS | 20 |
| 5.1. | Objetivo general. | 20 |
| 5.2. | Objetivos específicos. | 20 |
| 6. | MATERIAL Y MÉTODOS | 21 |
| 6.1. | Obtención de aislamientos. | 21 |
| 6.2. | Identificación fenotípica de los aislamientos. | 21 |
| 6.3. | Identificación molecular de los aislamientos. | 21 |
| 6.3.1. | Extracción de DNA genómico por lisis enzimática. | 21 |
| 6.3.2. | Identificación de especie mediante PCR. | 22 |
| 6.4. | Determinación fenotípica de resistencia a meticilina. | 23 |
| 6.5. | Detección del gen <i>mecA</i> y tipificación del SCC <i>mec</i> . | 24 |
| 6.5.1. | Metodología descrita por Zhang <i>et al.</i> | 25 |
| 6.5.2. | Metodología descrita por Kondo <i>et al.</i> | 27 |
| 6.6. | Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos. | 30 |
| 6.7. | Determinación de clonalidad. | 31 |
| 6.7.1. | Preparación de los discos. | 31 |
| 6.7.2. | Corte con enzima de restricción. | 32 |
| 6.7.3. | Electroforesis. | 32 |
| 7. | RESULTADOS | 34 |
| 7.1. | Identificación de los aislamientos. | 34 |
| 7.2. | Determinación fenotípica de resistencia a meticilina. | 36 |
| 7.3. | Detección del gen <i>mecA</i> y tipificación del SCC <i>mec</i> . | 36 |
| 7.4. | Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos. | 40 |
| 7.5. | Clonalidad de aislamientos. | 42 |

| | |
|---|----|
| 8. DISCUSIÓN | 45 |
| 9. CONCLUSIONES | 54 |
| 10. LITERATURA CITADA | 55 |
| ANEXOS Y APÉNDICES | |
| ANEXO I. Preparación de reactivos y soluciones. | 62 |
| ANEXO II. Resultados por aislamiento de <i>S. epidermidis</i> . | 65 |
| ANEXO III. Resultados por aislamiento de <i>S. haemolyticus</i> . | 68 |

LISTA DE TABLAS

| Tablas | Página |
|---|--------|
| 1. Tipos de complejos <i>ccr</i> . | 17 |
| 2. Tipos de SCC <i>mec</i> descritos para <i>S. aureus</i> . | 18 |
| 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para la identificación de <i>S. epidermidis</i> y <i>S. haemolyticus</i> . | 23 |
| 4. Lista de oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang <i>et al</i> para la detección de <i>mecA</i> y la tipificación del SCC <i>mec</i> . | 25 |
| 5. Lista de oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang <i>et al</i> para la determinación del complejo <i>mec</i> . | 26 |
| 6. Lista de oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang <i>et al</i> para la determinación del complejo <i>ccr</i> . | 26 |
| 7. Oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang <i>et al</i> para la determinación del complejo <i>ccr</i> tipo 5. | 26 |
| 8. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 1 de la metodología descrita por Kondo <i>et al</i> para la detección de <i>mecA</i> y la tipificación del complejo <i>ccr</i> , con modificación a tres iniciadores según Ruppé <i>et al</i> . | 28 |
| 9. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 2 de la metodología descrita por Kondo <i>et al</i> para la tipificación del complejo <i>mec</i> con el iniciador IS2L según lo descrito por Ruppé <i>et al</i> . | 28 |
| 10. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 3 de la metodología descrita por Kondo <i>et al</i> para la subtipificación de los SCC <i>mec</i> tipo I y IV. | 29 |

| | |
|--|----|
| 11. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 4 de la metodología descrita por Kondo <i>et al</i> para la subtipificación de los SCC <i>mec</i> tipo II, III y V. | 29 |
| 12. Identificación de aislamientos. | 35 |
| 13. Combinaciones de complejo <i>mec</i> y complejo <i>ccr</i> , encontrados en <i>S. epidermidis</i> . | 38 |
| 14. Combinaciones de complejo <i>mec</i> y complejo <i>ccr</i> , encontrados en <i>S. haemolyticus</i> . | 40 |
| 15. Concentración mínima inhibitoria y perfil de susceptibilidad a antimicrobianos en los aislamientos de <i>S. epidermidis</i> . | 41 |
| 16. Concentración mínima inhibitoria y perfil de susceptibilidad a antimicrobianos en los aislamientos de <i>S. haemolyticus</i> . | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1. Tipos de complejos <i>ccr</i> . | 12 |
| 2. PBP2a en cepas resistentes a meticilina. | 12 |
| 3. Estructura general del SCC <i>mec</i> . | 14 |
| 4. Clases de complejo <i>mec</i> . | 15 |
| 5. Bases para la definición de tipos y alotipos de recombinasas. | 16 |
| 6. Dendrograma de aislamientos de <i>S. epidermidis</i> . | 43 |
| 7. Dendrograma de aislamientos de <i>S. haemolyticus</i> . | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| <i>et al</i> | Y colaboradores |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| kb | Kilobases |
| L | Litros |
| M | Concentración molar |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mM | Concentración milimolar |
| nm | Nanómetros |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PM | Peso molecular |
| pMol | Concentración en picomoles |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| UV | Ultravioleta |
| v | Voltios |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |

RESUMEN

Los Estafilococos Coagulasa Negativa (ECN) se encuentran dentro de los principales agentes causales de infecciones asociadas a dispositivos médicos, principalmente bacteriemias. Entre las especies de ECN más frecuentemente aisladas de sangre se encuentran *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Las infecciones por *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* se asocian a una alta resistencia a los antimicrobianos. La resistencia a meticilina, fue reportada en 1961 en *Staphylococcus aureus* y se debe a la expresión del gen *mecA*, contenido en el casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*), que codifica la proteína PBP2a, responsable de una unión deficiente a antibióticos betalactámicos, con la consecuente inactividad de los mismos hacia las cepas de *S. aureus*. El *SCCmec* se encuentra presente en especies de ECN, incluso con mayor frecuencia y mayor variedad que en *S. aureus*. Para el desarrollo de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos: obtener aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* provenientes de sangre, determinar la resistencia a meticilina y presencia del gen *mecA*, así como caracterizar el tipo de *SCCmec* presente, obtener el perfil de resistencia a antibióticos y determinar la relación clonal. Se recolectaron 162 aislamientos clínicos de ECN provenientes de sangre y se realizó identificación de especie por PCR, así como la detección de resistencia a meticilina, por medios fenotípicos y moleculares. Se tipificó el casete cromosómico estafilocócico presente en los aislamientos por medio de PCR. Además, se realizaron ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos utilizando un sistema automatizado y se determinó la relación clonal de los aislamientos mediante electroforesis en gel por campos pulsados. De los 162 aislamientos analizados, 83 (51.2 %) y 59 aislamientos (36.4 %) fueron identificados mediante PCR como *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* respectivamente. El 84.3 % y el 93.2 % de los aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* respectivamente presentaron resistencia a meticilina, y el gen *mecA*. Se encontró una alta frecuencia del *SCCmec* tipo IV en *S. epidermidis* (44.4 %), mientras que el 14.5 % de los aislamientos de *S. haemolyticus* fueron del tipo V. La mayoría de los aislamientos de *S. haemolyticus* fueron no tipificables (70.5 %). Se encontró resistencia superior al 70% a norfloxacin, clindamicina, levofloxacin, trimetoprim/sulfametoxazol y eritromicina. No se encontraron clonas para ninguna de las especies analizadas. El porcentaje de resistencia a meticilina encontrado en *S. haemolyticus* fue mayor que el encontrado en *S. epidermidis*. Se encontró una alta frecuencia del *SCCmec* tipo IV en *S. epidermidis* (44.4 %), por lo que dicha especie es un probable reservorio del mismo. La mayoría de los aislamientos de *S. haemolyticus* fueron no tipificables, indicando la probable existencia de nuevas estructuras del *SCCmec*. No se identificaron clonas en ninguna de las dos especies analizadas, por lo que se descarta diseminación clonal.

ABSTRACT

Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) are among the main causative agents of infections associated with medical devices, particularly bacteremia. *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* are among the CNS species most frequently isolated from blood. Infections with *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* are associated with a high resistance to antimicrobials. Methicillin resistance was reported in 1961 in *Staphylococcus aureus* and is due to the expression of *mecA* gene in the Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC*mec*), which encodes PBP2a protein responsible for poor binding to beta-lactam antibiotics, with the consequent inactivity toward *S. aureus* strains. The SCC*mec* is found in species of CNS, even more frequently and in greater variety than in *S. aureus*. For the development of this work, the following objectives were established: to obtain isolates of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* from blood, determine methicillin resistance and presence of the *mecA* gene and characterize the type of SCC*mec* present, obtain the profile antibiotic resistance and determine the clonal relatedness. 162 clinical isolates from blood were collected and species identification by PCR was performed, as well as the detection of methicillin resistance by phenotypic and molecular means. SCC*mec* present in the isolates was typed by PCR. Moreover, antimicrobial susceptibility assays were performed using an automated system. Clonal relatedness was determined by pulsed-field gel electrophoresis. Among the 162 isolates tested, 83 (51.2 %) and 59 isolates (36.4 %) were identified by PCR as *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, respectively. 84.3 % and 93.2 % of the isolates of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* were resistant to methicillin, respectively, and harboured the *mecA* gene. A high frequency of type IV SCC*mec* was found in *S. epidermidis* (44.4 %), while 14.5 % of *S. haemolyticus* isolates were type V. Most *S. haemolyticus* isolates were nontypeable (70.5 %). Resistance levels were above 70 % for norfloxacin, clindamycin, levofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole and erythromycin. No clones for any of the species analyzed were found. The percentage of methicillin resistance in *S. haemolyticus* is higher than in *S. epidermidis*. A high frequency of the SCC*mec* type IV was detected in *S. epidermidis* (44.4 %), so that this species is likely a reservoir. Most isolates of *S. haemolyticus* were not typeable, indicating the probable existence of new structures of SCC*mec*. No clones were identified in any of the two species tested, which discards clonal spread.

1. INTRODUCCIÓN

Los Estafilococos Coagulasa Negativa (ECN) se encuentran dentro de los principales agentes causales de infecciones, principalmente bacteriemias. Entre las especies más frecuentemente aisladas de ECN se encuentran *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*. Estas especies se relacionan frecuentemente con infecciones en pacientes inmunocomprometidos a quienes se les ha instalado algún tipo de dispositivo médico.

La resistencia a metilina, fue reportada en los años sesenta en *Staphylococcus aureus*. Esta resistencia es conferida por la expresión del gen *mecA*, contenido en el casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*), que codifica la proteína PBP2a, responsable de la unión deficiente a antibióticos betalactámicos, con la consecuente inactividad de los mismos hacia las cepas de *S. aureus*. La presencia del *SCCmec* en especies de ECN complica las infecciones producidas por estos agentes, ya que confiere resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, por lo que las opciones de tratamiento son limitadas.

En este estudio se recolectaron aislamientos clínicos de ECN, recuperados de sangre. Posterior a su identificación a nivel especie por métodos fenotípicos y genotípicos, se realizó la detección de resistencia a metilina, así como la presencia del gen que codifica dicha resistencia (*mecA*). Una vez establecida la presencia del gen, se procedió a tipificar el casete cromosómico estafilocócico presente en los aislamientos de *S.*

epidermidis y *S. haemolyticus*. Posterior a ello, se determinó el perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos, así como la relación clonal.

El cumplimiento de los objetivos y el análisis de los datos obtenidos, permitirá contribuir a los estudios epidemiológicos necesarios para aumentar el estado del conocimiento sobre la virulencia y las infecciones causadas por ECN.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las especies de ECN, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* se encuentran dentro de los principales agentes causales de bacteriemias asociadas al uso de dispositivos médicos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las infecciones por *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* se asocian a una alta resistencia a los antimicrobianos, lo que las hace cada vez más complicadas de tratar, lo que en ocasiones conlleva limitadas o bien, nulas opciones de tratamiento.

El incremento en las infecciones provocadas por ECN hace que sea de suma importancia el contar con reportes y estudios adecuados sobre la caracterización de dichos agentes.

No se han realizado estudios sobre la epidemiología molecular de las infecciones causadas por *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* en México.

Por lo anterior, es importante la realización de estudios que incluyan la tipificación del SCC*mec*, el perfil de resistencia a antibióticos y la clonalidad de aislamientos obtenidos en México.

3. ANTECEDENTES

3.1. Importancia de los estafilococos coagulasa negativa.

Los estafilococos coagulasa negativa (ECN) se encuentran entre los principales agentes causales de infecciones nosocomiales. Son frecuentemente aislados en los laboratorios de bacteriología clínica, aunque en ocasiones su significado clínico ha sido discutida, ya que al ser microorganismos presentes en la microbiota normal de piel, mucosas y glándulas de mamíferos, en ocasiones pueden considerarse como contaminantes de los cultivos (Kloos and Bannerman, 1994; Sharma *et al.*, 2001; Garcia, 2004).

Los ECN actualmente son considerados como microorganismos patógenos oportunistas que se aíslan frecuentemente de pacientes que han experimentado alguna alteración en la piel, como son los sujetos sometidos a cirugía o con lesiones traumatológicas; de igual manera se aíslan de pacientes con dispositivos implantados como catéteres, prótesis, derivaciones, etc. También son frecuentemente aislados de pacientes inmunocomprometidos, así como de neonatos. Las infecciones en este tipo de pacientes incluso pueden conducir a la muerte (Forbes, 2007).

Entre las especies más frecuentemente aisladas de ECN se encuentran *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* (John and Harvin, 2007), los cuales son agentes causales importantes de bacteriemia, que además presentan altas proporciones de resistencia a meticilina, una característica que convierte a las infecciones

producidas por estas especies, en patologías difíciles de tratar, ya que presentan resistencia a prácticamente todos los antibióticos betalactámicos; limitando así, el tratamiento de estas infecciones (Widerstrom *et al.*, 2012).

3.2. Características microbiológicas y hábitat.

Desde el punto de vista microbiológico, los ECN son miembros del género *Staphylococcus*, son bacterias Gram positivas, catalasa positiva, e inmóviles que presentan agrupamiento en racimos. Una característica distintiva de los ECN y de hecho utilizada en la identificación, es la ausencia de la enzima coagulasa en su forma libre (Forbes, 2007).

En la recuperación de ECN de especímenes clínicos, se utiliza agar con sangre de carnero. Las colonias de ECN son generalmente lisas, de bordes regulares, de 1 a 3 mm de diámetro después de 24 horas de incubación. Las cepas de algunas especies de ECN pueden mostrar variación considerable en el tamaño de las colonias en la misma placa, dando la apariencia de un cultivo mixto (Forbes, 2007).

Los ECN son componentes de la microbiota normal de diversas partes de la piel y de las mucosas en el ser humano. También se localizan en otras regiones del cuerpo, como cuero cabelludo, conducto auditivo y fosas nasales (Kloos and Bannerman, 1994). Entre las especies de ECN que predominan en el cuerpo humano y que además se aíslan frecuentemente de muestras clínicas, se encuentran: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warnieri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus cohnii* (Longauerova, 2006).

La especie predominante de ECN, *S. epidermidis* es ampliamente distribuida sobre la superficie del cuerpo humano. Existen grandes poblaciones de *S. epidermidis* que viven en zonas húmedas del cuerpo humano como nariz, axilas y las zonas inguinal y perianal (Kloos and Bannerman, 1994; Forbes, 2007). De igual manera, *S. haemolyticus* se encuentra en grandes cantidades en sitios de la piel en donde se encuentran glándulas apocrinas, tales como axilas y zona inguinal.

Los ECN se encuentran distribuidos de manera importante, no solo en el ser humano, sino en diferentes especies de mamíferos tales como: caballos, cabras y animales domésticos (Kloos and Bannerman, 1994).

3.3. Identificación de los ECN.

Los ECN pueden ser identificados fácilmente a nivel de género por pruebas y métodos convencionales disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos. Sin embargo, la identificación a nivel especie es a menudo complicada y no siempre concluyente (Forbes, 2007).

En 1975, Kloos y Schleifer publicaron un esquema para la identificación bioquímica de los ECN. Este esquema utiliza la prueba de coagulasa para discriminar los ECN de *Staphylococcus aureus* y una batería de pruebas fisiológicas y bioquímicas para diferenciar las especies de ECN (Kloos and Schleifer, 1975).

Los procedimientos convencionales para la identificación de ECN requieren una gran cantidad de pruebas, además de tiempo y esfuerzo. Se han diseñado varios esquemas para facilitar dicha tarea (Kim *et al.*, 2008). Tales esquemas generalmente incluyen el perfil de asimilación de carbohidratos, pero dado que la mayoría de los ECN comparten

características, la identificación de especie por estos métodos a menudo es confusa y no confiable (Layer *et al.*, 2006).

Para *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* los sistemas bioquímicos han mostrado un buen desempeño en la identificación de especie, mostrando altos porcentajes de correlación. El sistema API ID test (bioMérieux, Durham, NC) ha mostrado ser de los que muestran mejores resultados (Heikens *et al.*, 2005; Garza-Gonzalez *et al.*, 2010).

Se han hecho comparaciones de los distintos métodos comerciales disponibles con métodos moleculares (Heikens *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). A pesar de que para las especies *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* generalmente los métodos bioquímicos dan buenos resultados, aun se presentan ciertas discrepancias, por lo que para una identificación definitiva se sugiere la secuenciación de distintos genes (Ghebremedhin *et al.*, 2008). Algunos de los genes utilizados para la secuenciación son: 16S RNAr, *gap*, *hsp60*, *rpoB*, *sodA* (Poyart *et al.*, 2001), *dnaJ* (Shah *et al.*, 2007) y *tuf*.

3.4. Infecciones causadas por *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*.

En general, los ECN son agentes causales de bacteriemia, endocarditis asociadas a válvula protética, osteomielitis, artritis, e infecciones relacionadas a las prótesis articulares, diálisis peritoneal, marcapasos, injertos vasculares, catéteres y derivaciones de fluido cerebroespinal. También existen reportes de infecciones oculares y cutáneas. Además, *S. saprophyticus* se ha establecido como un patógeno frecuente de infecciones en vías urinarias en mujeres (Widerstrom *et al.*, 2012).

Cuando los hallazgos clínicos correlacionan con el aislamiento de algún ECN, *S. epidermidis* es por mucho el microorganismo más frecuentemente recuperado, con

frecuencias que van del 50% al 80% (Burnie *et al.*, 1997; Garcia, 2004; Ibrahim *et al.*, 2008). Particularmente, *S. epidermidis* se encuentra asociado a infecciones asociadas al uso de dispositivos protésicos. Es agente causal principal de endocarditis asociada a válvula protésica, infecciones por catéteres y derivaciones de fluido cerebrospinal. Es el agente más comúnmente aislado en los casos de bacteriemia (Garcia, 2004).

S. haemolyticus ha presentado un incremento como causa de infecciones nosocomiales y es el segundo microorganismo más frecuentemente aislado de entre los ECN de importancia clínica (Barros *et al.*, 2012). Además, algunos reportes recientes han señalado a *S. haemolyticus* como la causa de infecciones severas como meningitis, infecciones en piel o tejidos blandos y bacteriemia (Shittu, 2004; Barros *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014).

3.5. Factores de virulencia de los ECN.

Aunque por mucho tiempo los ECN fueron considerados no patógenos, se han descrito factores de virulencia menores que favorecen el establecimiento de la infección y la persistencia del microorganismo en el cuerpo humano (Kloos and Bannerman, 1994).

En el establecimiento del microorganismo participan exoenzimas como lipasas y enzimas modificadoras de ácidos grasos que permiten la persistencia del microorganismo en secreciones, así como detoxificación de ácidos grasos que pueden resultar tóxicos para la bacteria. Además, poseen enzimas capaces de causar daño tisular como la cistina proteasa y metaloproteínasa Sep-1. Además, poseen moléculas capaces de inducir inflamación como las modulinas solubles en fenol (PSM) y el mismo peptidoglicano y ácido lipoteicoico (Gill *et al.*, 2005; Longauerova, 2006).

Sin embargo el principal factor de virulencia asociado a la permanencia del microorganismo en dispositivos médicos es la capacidad de formar biopelícula (Kloos and Bannerman, 1994; Longauerova, 2006; Otto, 2012). Las biopelículas son aglomeraciones de bacterias, a menudo formadas por un material viscoso que mantiene unidas a las células presentes en la biopelículas, así como a diferentes materiales, generalmente de tipo plástico (Dunne, 2002). El material extracelular del que está compuesta la biopelícula, provee una protección a los antibióticos, ya que el material impide la penetración del fármaco hacia las células que están presentes en la biopelícula (Donlan and Costerton, 2002; Otto, 2012).

S. epidermidis ha sido descrito como un excelente productor de biopelícula (Ziebuhr *et al.*, 2006; McCann *et al.*, 2008). La formación de la biopelícula ocurre en dos pasos: primero ocurre la adhesión inicial a la superficie inerte, seguida de una acumulación celular que formará la biopelícula madura (Davey and O'Toole, 2000).

Las adhesinas formadas de polisacáridos son responsables de la adhesión a la superficie y la adhesión intercelular. Dos polisacáridos han sido involucrados en la formación de la biopelícula: la adhesina de polisacárido capsular (PSA) y la adhesina de polisacárido intercelular (de Silva *et al.*, 2002). Ambos polisacáridos están compuestos principalmente de N-acetilglucosamina con enlaces glicosídicos β -1,6 (Otto, 2012).

S. haemolyticus también ha sido reportado como productor de biopelícula. Sin embargo, estudios han demostrado que la composición de la biopelícula en *S. haemolyticus* difiere de la biopelícula formada por *S. epidermidis*. Un estudio realizado

indica que proteínas y DNA extracelular son de gran importancia en la formación de la biopelícula por *S. haemolyticus* (Fredheim *et al.*, 2009).

3.6. Resistencia a meticilina en *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*.

Originalmente, la penicilina era el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones serias por *S. aureus*. El surgimiento de cepas resistentes a penicilinas fue debido a la adquisición de plásmidos que codifican β -lactamasas o penicilinasas.

Posteriormente se desarrollaron penicilinas semisintéticas resistentes a penicilinasas, que se utilizaron como el antibiótico de elección para las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, poco tiempo después aparecieron las primeras cepas resistentes a las penicilinas semisintéticas en *S. aureus*, particularmente a la meticilina (Eriksen, 1961). A raíz de ello, se acuñó el término *S. aureus* resistente a meticilina que es utilizado hoy en día para describir a las cepas de *S. aureus* que presentan fenotipo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas y agentes cefémicos (Barber, 1961; Eriksen, 1961).

Sin embargo, la resistencia a meticilina no solo ha sido descrita en *S. aureus*, si no que se ha reportado en especies de ECN aisladas de muestras clínicas, con proporciones incluso superiores a las reportadas en *S. aureus*. Así, es común el reporte de cepas *S. epidermidis* resistente a meticilina y *S. haemolyticus* resistente a meticilina (SHRM) aisladas de sangre o líquido cefalorraquídeo, con porcentajes de resistencia por encima del 70% para ambas especies (Miragaia *et al.*, 2002; Mombach Pinheiro Machado *et al.*, 2007; Kristof *et al.*, 2011).

Además, las cepas SERM y SHRM han sido aisladas de individuos sanos, que se encuentran colonizados por estas especies y que constituyen una fuente importante de diseminación de las mismas (Jamaluddin *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2009).

3.6.1. Mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en cepas resistentes a meticilina.

El peptidoglicano es un polímero que forma la pared celular de las bacterias, principalmente Gram positivos, cuya pared es de mayor dimensión a la presente en Gram negativos. La pared posee la función de mantener la presión osmótica de la célula, cualquier alteración en la continuidad de la pared podría resultar letal para la bacteria (Sauvage *et al.*, 2008).

El peptidoglicano está formado por cadenas de glicano, químicamente formado por N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico. Las cadenas de glicano se encuentran entrecruzadas por péptidos cortos.

Las proteínas de unión a penicilina (PBP) son transpeptidasas o carboxipeptidasas involucradas en el metabolismo del peptidoglicano, que catalizan la polimerización de la cadena de glicano (transglicosilación) y el entrecruzamiento entre las cadenas de glicano (transpeptidación) (Sauvage *et al.*, 2008).

El sustrato natural de las PBP, el extremo D-Ala-D-Ala del péptido que forma el entre cruzamiento en las cadenas de glicano, posee una similitud estructural con la estructura de los β -lactámicos, particularmente la penicilina, que al entrar en el sitio activo de la PBP queda unida de manera covalente, inhibiendo así, la función de la PBP y por tanto la síntesis de la pared, llevando al microorganismo a la lisis (Zapun *et al.*, 2008).

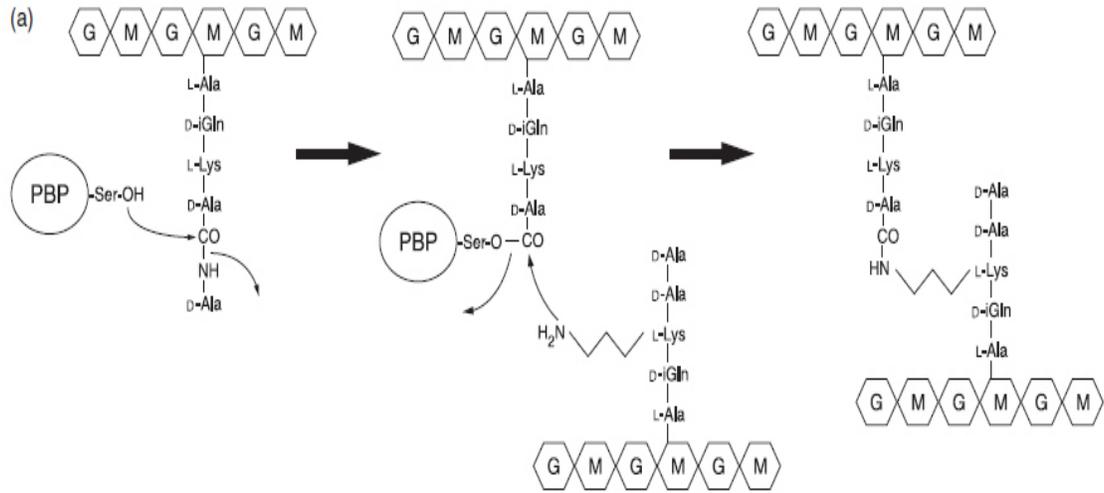


Figura 1. Mecanismo de acción de las PBP (Zapun *et al.*, 2008).

Las cepas resistentes a meticilina producen una proteína de unión a penicilina, conocida como PBP2a o PBP2' que presenta baja afinidad por los β -lactámicos y que aún posee la capacidad de catalizar la transpeptidación (Hartman and Tomasz, 1984; Katayama *et al.*, 2003). Por tanto, los antibióticos no quedan unidos covalentemente a la PBP, no ocurre inhibición de la síntesis del peptidoglicano y por tanto se evita la lisis celular (Zapun *et al.*, 2008).

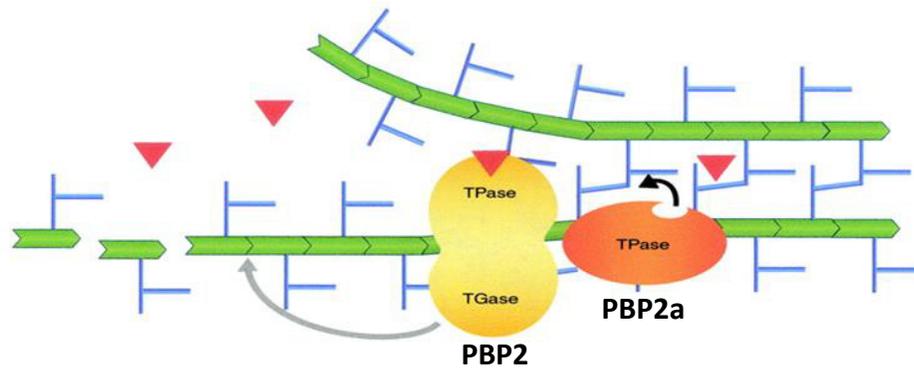


Figura 2. PBP2a en cepas resistentes a meticilina (Zapun *et al.*, 2008).

La proteína es codificada por el gen *mecA*, que se encuentra contenido en un elemento genético móvil denominado casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (Ito *et al.*, 1999; Katayama *et al.*, 2000). El SCC*mec* fue descrito por primera vez en una cepa SARM, cuya secuenciación sentó las bases para el estudio de las características básicas del SCC*mec*, así como su diversidad (Katayama *et al.*, 2000).

3.7. Características generales del SCC*mec*.

La integración del SCC*mec* es sitio-específica. Se integra en el sitio *attBSC* (*bacterial chromosomal attachment site*) que se encuentra cerca del origen de replicación de *S. aureus*. El sitio se encuentra dentro un marco de lectura abierto, denominado *orfX*, de función desconocida. Además, el sitio contiene una secuencia de 15 pares de bases, que después de la integración, queda duplicada a ambos lados del SCC*mec* (Katayama *et al.*, 2000; IWG-SCC, 2009). Además, el SCC*mec* posee secuencias de inserción (IS) que flanquean al gen *mecA*, así como genes reguladores de la expresión. El conjunto de regiones reguladoras, las secuencias de inserción y *mecA*, se denominan complejo *mec*. Han sido descritos varios tipos de complejo *mec*, dependiendo del tipo de IS presente en el entorno de *mecA*.

También, el SCC*mec* cuenta con varios genes que codifican para recombinasas, el conjunto de genes de recombinasas se denomina complejo *ccr*. Estas recombinasas son las encargadas de integrar el SCC*mec* en el cromosoma bacteriano y de la remoción del mismo del genoma. Existen diversas variantes del complejo *ccr*, cuya diferencia radica en el tipo de recombinasa presente.

Las regiones ubicadas entre el complejo *ccr*, el complejo *mec* y los extremos del *SCC_{mec}* se conocen como regiones J (joining regions), que contienen estructuras adicionales, tales como plásmidos o IS, que pueden proporcionar características adicionales de resistencia (IWG-SCC, 2008).

Los *SCC_{mec}* se clasifican en tipos y subtipos. Los tipos de *SCC_{mec}* están definidos por el tipo de complejo *mec* y el tipo de complejo *ccr* presente. Los subtipos se basan en diferencias presentes en las regiones J (joining regions) de un mismo *SCC_{mec}*. Estas diferencias pueden ser plásmidos, secuencias de inserción, o pseudogenes (IWG-SCC, 2009).

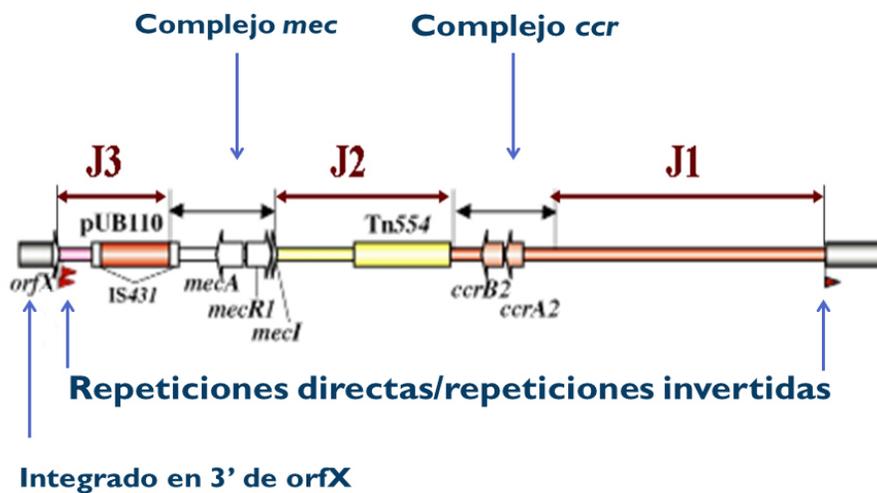


Figura 3. Estructura general del *SCC_{mec}* (IWG-SCC, 2008).

3.7.1. Complejo de genes *mec*.

El complejo *mec* está formado por *mecA*, los genes reguladores *mecI* y *mecR1*, así como diversas secuencias de inserción. A la fecha han sido descritos cinco tipos de clase *mec* para *S. aureus* (A-E) (IWG-SCC, 2009).

El complejo *mec* clase A es el complejo prototipo, que contiene al gen *mecA* y los genes reguladores *mecI* y *mecR1* completos. El complejo *mec* clase B se compone del gen *mecA* y el gen *mecR1* parcialmente deletado por la inserción de IS1272. El complejo *mec* clase C está formado por el gen *mecA* y el gen *mecR1* parcialmente deletado por la inserción de IS431. El complejo *mec* clase C se divide en dos variantes, C1 y C2, dependiendo de la orientación de la IS431 que deleta a *mecR1*. Si ambas IS431 tienen la misma orientación se trata del complejo *mec* clase C1, mientras que si están en distinta orientación se trata del complejo *mec* clase C2. El complejo *mec* clase D solo se compone de *mecA* y el gen *mecR1* deletado, pero sin presentar secuencia de inserción asociada. El complejo *mec* clase E, es similar al anterior solo que la delección de *mecR1* es de mayor proporción (IWG-SCC, 2008; IWGC-SCC, 2009). Todos los complejos presentan una IS431 subsecuente a *mecA*.

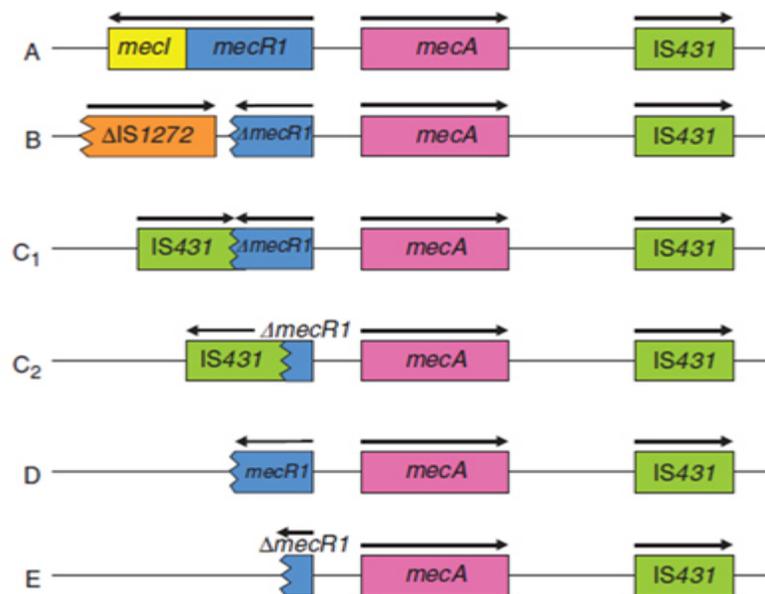


Figura 4. Clases de complejo *mec* (Hanssen and Ericson Sollid, 2006).

3.7.2. Complejo de genes *ccr*.

El complejo *ccr* está formado por los genes de recombinasas presentes en el *SCCmec*. A la fecha se han reportado tres diferentes tipos de recombinasas (*ccrA*, *ccrB* y *ccrC*) y distintos alotipos de cada una de ellas, dependiendo del grado de homología existente (Katayama *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004).

En general, si la homología entre dos recombinasas es menor al 50%, se considera un tipo distinto de recombinasa, pero si la homología se encuentra entre el 60% y el 82% puede considerarse como un alotipo o variante. Una similitud mayor al 87% se considera que forma parte de la misma variante o tipo de recombinasa (IWG-SCC, 2009).

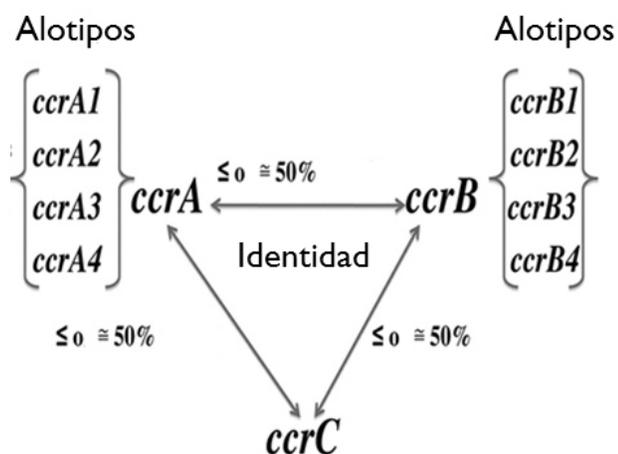


Figura 5. Bases para la definición de tipos y alotipos de recombinasas (IWG-SCC, 2009).

A la fecha, se han identificado varios alotipos para las recombinasas A y B, mientras que para la recombinasa C, solo se ha descrito un alotipo (IWG-SCC, 2008).

Dependiendo de las recombinasas y alotipos presentes en los distintos casetes, se han clasificado en ocho distintos tipos de complejos *ccr*:

Tabla 1. Tipos de complejos *ccr*.

| Complejo <i>ccr</i> | Genes <i>ccr</i> |
|----------------------------|-------------------------|
| Tipo 1 | A1B1 |
| Tipo 2 | A2B2 |
| Tipo 3 | A3B3 |
| Tipo 4 | A4B4 |
| Tipo 5 | C1 |
| Tipo 6 | A5B3 |
| Tipo 7 | A1B6 |
| Tipo 8 | A1B3 |

3.7.3. Regiones de unión (Regiones J).

Las regiones de unión (joining regions), anteriormente llamadas regiones basura (junkyard regions), son regiones que se encuentran entre los complejos *mec* y *ccr*. La región J1 es la región entre la unión cromosómica derecha y el complejo *ccr*. La región J2 está ubicada entre el complejo *ccr* y el complejo *mec*. La región J3 se ubica entre la unión cromosómica derecha y el complejo *mec*.

En estas regiones se pueden encontrar elementos como plásmidos o secuencias de inserción que proporcionar marcadores de resistencia adicionales. Basándose en estos elementos y además los pseudogenes presentes, se han definido subtipos de los SCC*mec* en *S. aureus* (IWG-SCC, 2009).

3.8. Tipos de SCC*mec*.

Hasta la fecha han sido descritos once tipos de SCC*mec* en *S. aureus*, basados en la combinación de complejo *mec* y complejo *ccr* (Ito *et al.*, 2001, 2004; Ma *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006; Berglund *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Shore *et al.*, 2011):

Tabla 2. Tipos de SCC*mec* descritos para *S. aureus*.

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

4. HIPÓTESIS

Los aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* presentan distintos tipos de SCC*mec*, así como distintos perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos y diferentes grupos clonales entre sí.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Tipificar el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) en cepas de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* aislados de sangre, así como determinar la clonalidad de los aislamientos y su perfil de resistencia a antibióticos.

5.2. Específicos

1. Obtener aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* provenientes de sangre e identificarlos a nivel especie.
2. Determinar fenotipo de resistencia a meticilina.
3. Tipificar el tipo de SCC*mec* presente en los aislamientos resistentes a meticilina.
4. Obtener el perfil de resistencia a antibióticos de los aislamientos.
5. Determinar la clonalidad de los aislamientos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Obtención de aislamientos.

Se colectaron 164 aislamientos de ECN provenientes de sangre, aislados en el Laboratorio Central del Hospital Universitario “José Eleuterio González” y el Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.

6.2. Identificación fenotípica de los aislamientos.

Para la identificación mediante características fenotípicas se confirmaron las pruebas de catalasa y coagulasa, así como la tinción de Gram. Los aislamientos fueron identificados por el sistema Sensititre (TREK Diagnostic Systems Inc., Cleveland, OH) como *S. epidermidis* (n=59), *S. haemolyticus* (n=57), *S. hominis* (n=4), *S. saprophyticus* (n=3), *S. capitis* (n=1), *S. warneri* (n=1) y *S. xylosus* (n=1). El resto de los aislamientos se identificó a nivel de género como estafilococo coagulasa negativa (n=38). Los aislamientos se conservaron en congelación a -70°C en caldo Brucella con glicerol al 15%.

6.3. Identificación molecular de los aislamientos.

Para la identificación molecular se realizó extracción de ADN genómico por el método de fenol-cloroformo con lisis enzimática para posteriormente realizar la identificación a nivel especie por medio de PCR.

6.3.1. Extracción de DNA genómico por lisis enzimática.

Los aislamientos se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron a 37°C por 18-24 h. Posterior a la incubación, se realizó una suspensión bacteriana en un vial con 200

μl de Tris-HCl y se agregaron 150 μg de lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá). La suspensión se incubó en baño de agua a 37°C durante al menos 12 h. Después de la incubación, se añadieron 6 μl de proteinasa K (10 mg/ml). Se llevó a incubación a 55°C por 2 h.

Para la extracción de ADN se añadieron 250 μl de fenol saturado, 250 μl de SEVAG y 100 μl de TE 1X; se realizó agitación vigorosa por 5 min. La fase acuosa y la fase orgánica fueron separadas mediante centrifugación durante 8 min a 14000 rpm. Una vez separadas, la fase acuosa fue transferida a un nuevo vial y se realizó una segunda extracción.

La fase acuosa de la segunda extracción se transfirió a otro vial, midiendo el volumen recuperado. Se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto a 4°C a fin de precipitar el ADN. Se dejó precipitando a -20°C por una hora. Posterior a la precipitación, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante cuidando de no desprender la pastilla de ADN. Se realizaron dos lavados de la pastilla con etanol al 70 %. Después de los lavados el ADN se dejó secando a temperatura ambiente. Una vez seco, se disolvió en 100 μl de TE 1X y se calentó a 65°C por 15 min en baño de agua antes de utilizarse.

6.3.2. Identificación de especie mediante PCR.

Se realizó una PCR múltiple de identificación utilizando los oligonucleótidos y las condiciones descritas (Hirota *et al.*, 2011). La PCR amplificó regiones específicas del gen de la termonucleasa *nuc*.

La reacción de PCR utilizó 0.5 μl del ADN obtenido por lisis enzimática en 24.5 μl de mezcla de reacción compuesta por: 200 μM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer

1X (NH₄ 1X pH 8.8), 3 μM de MgCl₂, 0.2 μM de cada oligonucleótido (Tabla 3) y 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.).

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para la identificación de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*.

| Oligonucleótido | Secuencia | Producto (pb) | Especificidad |
|-----------------|----------------------|---------------|------------------------|
| epi-F | TTGTAAACCATTCTGGACCG | 251 | <i>S. epidermidis</i> |
| epi-R | ATGCGTGAGATACTTCTTCG | | |
| hae-F | TAGTGGTAGGCGTATTAGCC | 434 | <i>S. haemolyticus</i> |
| hae-R | ACGATATTTGCCATTCGGTG | | |

Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización (95°C, 5 min); 30 ciclos de: desnaturalización (95°C, 30 s), alineamiento (58°C, 30 s), y extensión (72°C, 70 s); y un paso final de elongación a 72°C por 2 min.

Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5X, previa tinción con bromuro de etidio (1 mg/ml). Se empleó un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm. Como controles de la amplificación se utilizaron las cepas ATCC 14990 de *Staphylococcus epidermidis*, y ATCC 29970 de *Staphylococcus haemolyticus*.

6.4. Determinación fenotípica de resistencia a meticilina.

Se utilizó la metodología descrita por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en el documento M02-A11 (CLSI, 2012). A partir de un cultivo puro en agar sangre, de 18-24 h, se realizó una suspensión en solución estéril de NaCl al 0.85%. La suspensión se ajustó al estándar 0.5 de la escala de MacFarland. Dentro de los primeros 15

minutos después de la preparación de la suspensión, se utilizó para inocular una placa de agar Müeller-Hinton. La suspensión fue distribuida en toda la superficie del agar utilizando un hisopo, rotando la placa en ángulos de 60°. Se dejó que el exceso de humedad se absorbiera durante 3 a 5 min.

Dentro de los primeros 15 min después de la inoculación de la placa, se colocó un disco de cefoxitina de 30 µg con unas pinzas estériles, presionando ligeramente. Una vez colocado el disco, la placa se incubó durante 24 h a 35°C en atmósfera aerobia.

Se incluyeron como controles las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44. Para los controles se realizó el mismo procedimiento salvo que el tiempo de incubación fue de 16-18 h.

Posterior a la incubación se midieron los halos de inhibición en milímetros. Para la interpretación tanto de los aislamientos como de los controles, se utilizaron los lineamientos establecidos por el CLSI en el documento M100-S24 (CLSI, 2014). Los aislamientos que presentaron un halo de inhibición igual o mayor a 25 mm se consideraron como aislamientos sensibles a meticilina, mientras que los aislamientos con un halo igual o menor a 24 mm se consideraron resistentes. Para los controles un halo igual o mayor a 22 mm fue considerado sensible y un halo igual o menor a 21 mm fue considerado resistente.

6.5. Detección del gen *mecA* y tipificación del SCC*mec*.

Se utilizaron dos metodologías descritas anteriormente para la tipificación del SCC*mec* en *S. aureus*:

6.5.1. Metodología descrita por Zhang *et al.*

Se realizaron tres PCR múltiples y una convencional. La primer PCR múltiple determina la presencia del gen *mecA*, así como el tipo de SCC*mec* presente mediante la detección de loci específicos para cada casete (SCC*mec* tipos I, II, III, IV y V), además identifica subtipos del SCC*mec* tipo IV (IVa, IVb, IVc y IVd). La segunda PCR múltiple determina la clase de complejo *mec* (A y B), mientras que la tercera PCR detecta el tipo de complejo recombinasa presente (complejos *ccr* 1, 2 y 3). La PCR convencional amplifica el complejo *ccr* tipo 5 (*ccrC*).

Para las PCRs múltiples, como para la PCR convencional, la reacción utilizó 1 μ l del ADN obtenido por lisis enzimática en 24 μ l de mezcla de reacción compuesta por: 200 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), 3 μ M de MgCl₂, y 1 U de *Taq* polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Los oligonucleótidos fueron añadidos en las concentraciones que se detallan en las tablas:

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang *et al* para la detección de *mecA* y la tipificación del SCC*mec*.

| Iniciador | Secuencia (5'-3') | [μ M] | Producto (pb) | SCC <i>mec</i> |
|------------|--------------------------|------------|---------------|--------------------|
| Tipo I-F | GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG | 0.048 | 613 | SCC <i>mec</i> I |
| Tipo I-R | GTTCTCTCATAGTATGACGTCC | | | |
| Tipo II-F | CGTTGAAGATGATGAAGCG | 0.032 | 398 | SCC <i>mec</i> II |
| Tipo II-R | CGAAATCAATGGTTAATGGACC | | | |
| Tipo III-F | CCATATTGTGTACGATGCG | 0.04 | 280 | SCC <i>mec</i> III |
| Tipo III-R | CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG | | | |
| Tipo IVa-F | GCCTTATTCGAAGAAACCG | 0.104 | 776 | SCC <i>mec</i> IVa |
| Tipo IVa-R | CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG | | | |
| Tipo IVb-F | TCTGGAATTACTTCAGCTGC | 0.092 | 493 | SCC <i>mec</i> IVb |
| Tipo IVb-R | AAACAATATTGCTCTCCCTC | | | |
| Tipo IVc-F | ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC | 0.078 | 200 | SCC <i>mec</i> IVc |

| | | | | |
|-------------|-------------------------|-------|-----|--------------------|
| Tipo IVc-R | TTGGTATGAGGTATTGCTGG | | | |
| Tipo IVd-F5 | CTCAAAATACGGACCCCAATACA | 0.28 | 881 | SCC <i>mec</i> IVd |
| Tipo IVd-R6 | TGCTCCAGTAATTGCTAAAG | | | |
| Tipo V-F | GAACATTGTTACTTAAATGAGCG | 0.06 | 325 | SCC <i>mec</i> V |
| Tipo V-R | TGAAAGTTGTACCCCTTGACACC | | | |
| MecA147-F | GTGAAGATATACCAAGTGATT | 0.046 | 147 | <i>mecA</i> |
| MecA147-R | ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT | | | |

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang *et al* para la determinación del complejo *mec*.

| Iniciador | Secuencia (5'-3') | [μ M] | Producto (pb) | Clase <i>mec</i> |
|-----------------|--------------------------|------------|---------------|--------------------|
| <i>mecI</i> -F | CCCTTTTATACAATCTCGTT | 0.08 | 146 | <i>mec</i> clase A |
| <i>mecI</i> -R | ATATCATCTGCAGAATGGG | | | |
| IS1272-F | TATTTTTGGGTTTCACTCGG | 0.08 | 1,305 | <i>mec</i> clase B |
| <i>mecR</i> 1-R | CTCCACGTTAATTCCATTAATACC | | | |

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang *et al* para la determinación del complejo *ccr*.

| Iniciador | Secuencia (5'-3') | [μ M] | Producto (pb) | Tipo <i>ccr</i> |
|---------------------------|--------------------------|------------|---------------|-------------------|
| <i>ccrAB</i> - β 2 | ATTGCCTTGATAATAGCCITCT | 0.08 | | |
| <i>ccrAB</i> - α 2 | AACCTATATCATCAATCAGTACGT | 0.08 | 700 | <i>ccr</i> tipo 1 |
| <i>ccrAB</i> - α 3 | TAAAGGCATCAATGCACAAACT | 0.08 | 1,000 | <i>ccr</i> tipo 2 |
| <i>ccrAB</i> - α 4 | AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT | 0.08 | 1,600 | <i>ccr</i> tipo 3 |

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la metodología descrita por Zhang *et al* para la determinación del complejo *ccr* tipo 5.

| Iniciador | Secuencia (5'-3') | [μ M] | Producto (pb) | Tipo <i>ccr</i> |
|----------------|------------------------|------------|---------------|-------------------|
| <i>ccrC</i> -F | ATGAATTCAAAGAGCATGGC | 0.08 | 336 | <i>ccr</i> tipo 5 |
| <i>ccrC</i> -R | GATTTAGAATTGTCGTGATTGC | | | |

La amplificación de las tres PCRs múltiples se llevó a cabo con un paso inicial de desnaturalización (94°C, 5 min); 10 ciclos de: desnaturalización (94°C, 45 s), alineamiento

(65°C, 45 s), y extensión (72°C, 90 s); además, 25 ciclos de: desnaturalización (94°C, 45 s), alineamiento (55°C, 45 s), y extensión (72°C, 90 s); y un paso final de elongación a 72°C por 10 min.

La amplificación de la PCR convencional se llevó a cabo con un paso inicial de desnaturalización (94°C, 5 min); 35 ciclos de: desnaturalización (94°C, 60 s), alineamiento (50°C, 60 s), y extensión (72°C, 120 s); y un paso final de elongación a 72°C por 10 min.

Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% con TBE 0.5X, previa tinción con bromuro de etidio (1 mg/ml). Se empleó un marcador de 100-10,000 pb (HyperLadder™ I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm.

6.5.2 Metodología descrita por Kondo *et al.*

Se utilizaron cuatro PCRs múltiples. La M-PCR 1 amplificó el gen *mecA*, así como el tipo de complejo *ccr* (complejos 1 a 5). En esta M-PCR se realizó una modificación al par de iniciadores para el complejo *ccr* tipo 4 y a un iniciador del par para el complejo *ccr* tipo 5 (Ruppe *et al.*, 2009). La M-PCR 2 detectó el complejo *mec* presente (A, B y C), en esta M-PCR se añadió un iniciador a fin de detectar las variantes C1 y C2 del complejo *mec* (Ruppe *et al.*, 2009). La M-PCR 3 identifica subtipos de los SCC*mec* tipo I y IV, mientras que la M-PCR 4 identifica subtipos de los SCC*mec* tipo II, III y V.

Para las cuatro M-PCR, la reacción de PCR utilizó 1 µl del DNA obtenido por lisis enzimática en 24 µl de mezcla de reacción compuesta por: 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), 3 µM de MgCl₂, 0.1 µM de cada oligonucleótido y 1 U de Taq polimerasa.

Tabla 8. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 1 de la metodología descrita por Kondo *et al* para la detección de *mecA* y la tipificación del complejo *ccr*, con modificación a tres iniciadores según Ruppé *et al* (Ruppe *et al.*, 2009).

| Iniciador | Secuencia (5' - 3') | Genes o alelos | Producto (pb) |
|-----------|-----------------------------|-------------------|---------------|
| mA1 | TGCTATCCACCCTCAAACAGG | <i>mecA</i> | 286 |
| mA2 | AACGTTGTAACCACCCCAAGA | | |
| 1 | AACCTATATCATCAATCAGTACGT | <i>ccr</i> tipo 1 | 695 |
| 2 | TAAAGGCATCAATGCACAAACACT | <i>ccr</i> tipo 2 | 937 |
| 3 | AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT | <i>ccr</i> tipo 3 | 1,791 |
| βc | ATTGCCTTGATAATAGCCITCT | | |
| α4U | GCGACGAATCAAATGTCCTTACTG | <i>ccr</i> tipo 4 | 1,304 |
| β4U | ATCGCTCCAGTGTCTATACTTCGC | | |
| γF | CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT | <i>ccr</i> tipo 5 | 607 |
| ccrCU1 | TTACCTTTGACCAATATCACATC | | |

Tabla 9. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 2 de la metodología descrita por Kondo *et al* para la tipificación del complejo *mec* con el iniciador IS2L según lo descrito por Ruppé *et al* (Ruppe *et al.*, 2009).

| Iniciador | Secuencia (5' - 3') | Genes o alelos | Producto (pb) |
|-----------|----------------------------|---------------------|---------------|
| mI6 | CATAACTTCCCATCTGCAGATG | <i>mec</i> clase A | 1,963 |
| IS7 | ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG | <i>mec</i> clase B | 2,827 |
| IS2(iS-2) | TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT | <i>mec</i> clase C2 | 804 |
| IS2L | GAACCGCAGGTCTCTTCAGATC | <i>mec</i> clase C1 | 804 |
| mA7 | ATATACCAAACCCGACAACTACA | | |

Tabla 10. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 3 de la metodología descrita por Kondo *et al* para la subtipificación de los SCCmec tipo I y IV.

| Iniciador | Secuencia (5' - 3') | Subtipo | Producto (pb) |
|-----------|---------------------------|------------|---------------|
| 1a3 | TTTAGGAGGTAATCTCCTTGATG | SCCmec I.1 | 154 |
| 1a4 | TTTTGCGTTTGCATCTCTACC | | |
| 4a1 | TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT | SCCmec IVa | 458 |
| 4a3 | AGAAAAGATAGAAGTTCGAAAGA | | |
| 4b3 | AACCAACAGTGGTTACAGCTT | SCCmec IVb | 726 |
| 4b4 | CGGATTTTAGACTCATCACCAT | | |
| 4c4 | AGGAAATCGATGTCATTATAA | SCCmec IVc | 259 |
| 4c5 | ATCCATTTCTCAGGAGTTAG | | |
| 4d3 | AATTCACCCGTACCTGAGAA | SCCmec IVd | 1,242 |
| 4d4 | AGAATGTGGTTATAAGATAGCTA | | |

Tabla 11. Lista de oligonucleótidos utilizados en la M-PCR 4 de la metodología descrita por Kondo *et al* para la subtipificación de los SCCmec tipo II, III y V.

| Iniciador | Secuencia (5' - 3') | Subtipo | Producto (pb) |
|-----------|--------------------------|-------------|---------------|
| kdpB1 | GATTACTTCAGAACCAGGTCAT | SCCmec II.1 | 287 |
| kdpB2 | TAAACTGTGTCACACGATCCAT | | |
| 2b3 | GCTCTAAAAGTTGGATATGCG | SCCmec II.2 | 1,518 |
| 2b4 | TGGATTGAATCGACTAGAATCG | | |
| 4b3 | AACCAACAGTGGTTACAGCTT | SCCmec II.3 | 726 |
| 4b4 | CGGATTTTAGACTCATCACCAT | | |
| II4-3 | GTACCGCTGAATATTGATAGTGAT | SCCmec II.4 | 2,003 |

| | | | |
|-------|------------------------|----------------------|-------|
| II4-1 | ACTCTAATCCTAATCACCGAAC | | |
| 3a1 | ATGGCTTCAGCATCAATGAG | SCC <i>mec</i> III.1 | 503 |
| 3a2 | ATATCCTTCAAGCGCGTTTC | | |
| 5a1 | ACCTACAGCCATTGCATTATG | SCC <i>mec</i> V.1 | 1,159 |
| 5a2 | TGTATACATTTGCCACTAGCT | | |

La amplificación para la M-PCR 1 se llevó a cabo con un paso inicial de desnaturalización (95°C, 5 min); 30 ciclos de: desnaturalización (94°C, 120 s), alineamiento (57°C, 60 s), y extensión (72°C, 120 s); y un paso final de elongación a 72°C por 2 min. Para las M-PCR 2 a 4 se utilizaron las mismas condiciones salvo que la temperatura de alineamiento fue de 60°C. Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% con TBE 0.5x, previa tinción con bromuro de etidio (1 mg/ml). Se empleó un marcador de 100-10,000 pb (HyperLadder™ I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm.

6.6 Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos.

Se utilizó el sistema de incubación y lectura automatizados ARIS 2X (Trek Diagnostic Systems) con las placas del sistema Sensititre (TREK Diagnostic Systems Inc., Cleveland, OH).

A partir de un cultivo puro en agar sangre, de 18-24 h, se realizó una suspensión en agua estéril. La turbidez se midió en el nefelómetro y auto inoculador (Trek Diagnostic Systems), la suspensión se ajustó al estándar 0.5 de la escala de MacFarland. Dentro de los siguientes 15 min, se tomaron 30 µl para inocular caldo Müeller-Hinton con cationes ajustados.

El caldo fue distribuido en las placas del sistema Sensititre con el auto inoculador. Se llevó a incubación en el sistema Aris 2x. La elección de antibióticos y la interpretación se llevaron a cabo según los lineamientos establecidos por el CLSI en el documento M100-S24 (CLSI, 2014).

6.7 Determinación de clonalidad.

A fin de determinar la clonalidad de los aislamientos se realizó electroforesis en gel por campos pulsados (EGCP). Se llevó a cabo utilizando un protocolo descrito para *S. aureus* (Chung *et al.*, 2000), con modificaciones para ECN en las condiciones de corrida (Hanssen *et al.*, 2004).

6.7.1. Preparación de los discos.

Los aislamientos fueron sembrados en una placa de agar soya tripticasa e incubados a 37°C por 18 h. A partir del cultivo anterior se tomó una colonia y se inoculó en 5 ml de caldo soya tripticasa y se incubó durante 16 a 18 h a 37°C. Se transfirieron 2 ml del cultivo líquido a un vial y se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm.

El sobrenadante fue decantado y la biomasa fue resuspendida en 1 ml de PIV a 4°C mediante agitación en vórtex. La suspensión fue centrifugada a 14000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se añadieron 410 µl de PIV. Nuevamente, se resuspendió la biomasa mediante agitación en vórtex.

Además, se prepararon 10 ml de agarosa para campos pulsados (Agarosa Certificada para Campos Pulsados, Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) al 1.5% en TBE 0.5X y se mantuvo a 70°C para evitar que solidificara. Se añadieron 150 µl de la agarosa a la suspensión bacteriana en PIV, se mezcló y se tomaron 35 µl de la mezcla. Con los 35 µl se formó un disco de agarosa sobre un portaobjetos estéril. Se formaron 6 discos por

aislamiento y se dejaron solidificar. Una vez solidificados se cubrieron con un portaobjetos estéril.

Los discos fueron transferidos a un tubo cónico estéril de 15 ml y se agregó 1 ml de solución EC-lisis. Los tubos se incubaron a 37°C por 24 h. Después de la incubación se eliminó la solución EC-lisis y se añadió 1 ml de solución ESP. Los tubos se incubaron por 17 h a 55°C. Posterior a la incubación se eliminó la solución ESP y se añadieron 13 ml de buffer TE 1X, los tubos se mantuvieron en agitación por una hora. Se eliminó el buffer y se añadieron nuevamente 13 ml de TE 1X para mantener en agitación una hora. El proceso se realizó cinco veces. Una vez finalizados los lavados, los discos se almacenaron a 4°C en un tupo Eppendorf con 1 ml de TE 1X estéril.

6.7.2. Corte con enzima de restricción.

Se transfirió un disco de cada aislamiento a un tubo Eppendorf estéril de 2 ml. Al tubo se añadieron 40 µl mezcla de reacción sin enzima y se dejó acondicionar por 30 min. Posteriormente, se eliminó la mezcla de reacción y se añadieron otros 40 µl de mezcla de reacción con enzima para realizar el corte. Se utilizó la enzima SmaI (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). Se llevó a incubación por 12 h a 30°C.

6.7.3. Electroforesis.

Se realizó la limpieza del equipo (CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad) con 7 L de agua destilada estéril y 10 ml de hipoclorito de sodio al 5 %. Se hicieron recircular en la cámara por 20 min. Después de la limpieza, el agua con cloro se eliminó y se enjuagó la cámara con 7 L de agua destilada estéril durante 20 minutos. Posterior al enjuagado se añadieron 7 L de TBE 0.5X estéril y se hicieron

recircular en la cámara a 14°C. Posterior a la incubación de los discos con la enzima de restricción, se les añadieron 4 µL de buffer de carga 10X, compuesto de: SDS 0.9%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.05% (Takara Bio Inc., Shiga, Japón).

Se preparó un gel de agarosa para campos pulsados al 1% en buffer TBE 0.5X estéril, se preparó un excedente de 10 ml para cubrir los pocillos. Una vez solidificado el gel, los discos se introdujeron en los pocillos con la ayuda de espátulas estériles. Después de la colocación se cubrieron los pocillos con agarosa fundida. Una vez solidificada, el gel se introdujo en la cámara con buffer y se dio inicio a la corrida con las siguientes condiciones: T inicial 1 s, T final 35 s, tiempo de corrida 24 h; voltaje 6 V, ángulo 120.

Al concluir la corrida, se retiró el gel del equipo y se realizó tinción con bromuro de etidio 1 µg/mL por 10 min y se lavó con agua destilada, por último se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm (Fotodocumentador UVP Biolmaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom).

El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual tomando en cuenta los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995); los datos obtenidos fueron analizados empleando 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.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de los aislamientos.

De los 162 aislamientos analizados, 83 (51.2 %) fueron identificados mediante PCR como *S. epidermidis*, mientras que 59 aislamientos (36.4 %) fueron identificados como *S. haemolyticus*. El resto de los aislamientos (n=20, 12.3 %) no fue identificado como *S. epidermidis* o *S. haemolyticus*; por esta razón en el estudio se incluyeron solamente los 142 aislamientos identificados a nivel especie por PCR.

Entre los aislamientos previamente identificados como *S. epidermidis* por el sistema Sensititre, el 73.7 % (42/57) coincidió en la identificación por PCR, mientras que un aislamiento (1.8 %) fue identificado como *S. haemolyticus*. El resto de los aislamientos (14/57, 24.6 %) no generó banda para la especie *S. epidermidis*.

De los aislamientos identificados previamente por el sistema Sensititre como *S. haemolyticus*, el 89.5 % (51/57) coincidió en la identificación por PCR. Del resto, un aislamiento (1.75 %) fue identificado como *S. epidermidis* y 5 de 57 aislamientos (8.8 %) no generaron banda para la especie *S. haemolyticus*.

En el grupo de aislamientos identificados solo como ECN por pruebas bioquímicas (n= 38), el 86.8 % (33/38) fue identificado como *S. epidermidis* por medio de PCR, el resto de los aislamientos (5/38, 13.2%) fue identificado como *S. haemolyticus*.

De los 10 aislamientos de especies diferentes de *S. haemolyticus* o *S. epidermidis* identificados por pruebas bioquímicas, el 100% de los aislamientos de *S. saprophyticus* (3/3), *S. capitis* (1/1) y *S. xylosus* (1/1) fueron identificados como *S. epidermidis* por PCR. El aislamiento identificado como *S. warneri* por pruebas bioquímicas (n=1) fue identificado como *S. haemolyticus* por PCR.

De los aislamientos de *S. hominis* (n=4), dos se identificaron como *S. epidermidis*, uno como *S. haemolyticus* y uno no fue posible identificarlo por medio de PCR.

Tabla 12. Identificación de aislamientos.

| No. de aislamientos | Identificación fenotípica | Identificación por PCR | Identificación definitiva |
|---------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| 51 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| 42 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 33 | ECN | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 5 | ECN | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| 3 | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 2 | <i>S. hominis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 1 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 1 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1 | <i>S. capitis</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 1 | <i>S. xylosus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| 1 | <i>S. warneri</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1 | <i>S. hominis</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
| 1 | <i>S. hominis</i> | No identificado | No identificado |
| 14 | <i>S. epidermidis</i> | No identificado | No identificado |
| 5 | <i>S. haemolyticus</i> | No identificado | No identificado |

7.2 Determinación fenotípica de resistencia a meticilina.

El porcentaje global de resistencia a meticilina, determinado por el método de difusión en placa utilizando un disco de cefoxitina, fue de 88.02 % (125/142).

En *S. epidermidis* el porcentaje de resistencia por el mismo método, fue de 84.3 % (70/83), mientras que en *S. haemolyticus* fue de 93.2 % (55/59).

7.3 Detección del gen *mecA* y tipificación del SCC*mec*.

El gen *mecA* fue amplificado en 72 de los 83 aislamientos de *S. epidermidis* (86.7 %). Estos resultados fueron corroborados tanto por el método de Zhang, como por el de Kondo. Así mismo, en *S. haemolyticus*, 55 de 59 (93.2 %) aislamientos amplificaron el gen *mecA* por ambas metodologías.

Entre los aislamientos de *S. epidermidis* que contenían el gen *mecA* (72 aislamientos), solo a 37 (51.4 %) pudo asignársele un tipo de SCC*mec* según lo descrito para *S. aureus*; cinco aislamientos (6.9 %) presentaron SCC*mec* tipo III (*ccr* tipo 3, clase *mec* A) y 32 aislamientos (44.4 %) presentaron SCC*mec* tipo IV (*ccr* tipo 2, clase *mec* B). Los resultados anteriores fueron concordantes por ambas metodologías (Tabla 13).

Además, se detectaron algunos subtipos de los SCC*mec* encontrados, según la metodología de Kondo *et al.* Para el SCC*mec* tipo IV, 22 aislamientos (68.8 %) fueron subtipificados como IVa, mientras que solo un aislamiento (3.1 %) fue del subtipo IVb. Los demás aislamientos (9, 28.1 %) con SCC*mec* tipo IV no presentaron ninguno de los subtipos analizados (IVa, IVb, IVc y IVd). Los cinco aislamientos del SCC*mec* tipo III fueron subtipificados como subtipo III.1.

En los 35 aislamientos restantes, cuatro aislamientos (10.8 %) presentaron combinaciones no incluidas en el esquema de tipificación para *S. aureus*: tres aislamientos presentaron la combinación complejo *mec* clase A y complejo *ccr* tipo 1; un aislamiento presentó la combinación complejo *mec* clase A y complejo *ccr* tipo 5, esto por ambas metodologías. Sin embargo, un aislamiento se clasificó como variante del SCC*mec* tipo II (complejo *mec* clase A, complejo *ccr* tipo 2), ya que además presentó el complejo *ccr* tipo 1, resultados concordantes por ambas metodologías.

Cinco aislamientos presentaron complejo *mec* clase B y doble complejo *ccr* (1+2); de igual manera un aislamiento presentó complejo *mec* clase A y doble complejo *ccr* (2+3), resultados determinados por ambos métodos.

Trece aislamientos presentaron discrepancias entre los métodos utilizados, en la tipificación del complejo *ccr* tipo 5 por el método de Zhang *et al*, ya que siete de estos aislamientos tipificaron complejo *mec* clase A y complejo *ccr* tipo 3 por ambos métodos, sin embargo por el método de Kondo, además amplificaron el complejo *ccr* tipo 5. De igual manera, cinco aislamientos amplificaron complejo *mec* clase B y complejo *ccr* tipo 2, por ambas metodologías, pero además tipificaron para el complejo *ccr* tipo 5 por el método de Kondo *et al*.

De manera similar ocurrió en la tipificación del complejo *ccr* 4 por el método de Kondo, ya que esta metodología incluye la detección de este complejo, no así la metodología de Zhang, por lo que seis aislamientos amplificaron el complejo *ccr* 4, además de otros complejos *ccr*, cuyos resultados concordaron por ambas metodologías; dos aislamientos complejo *mec* clase A, complejo *ccr* tipos 1 y 5; dos aislamientos

complejo *mec* clase A, complejo *ccr* tipo 2; un aislamiento complejo *mec* clase A, complejo *ccr* tipo 3 y un aislamiento complejo *mec* clase B, complejo *ccr* tipo 2.

También se presentó discrepancia en la tipificación del complejo *mec* en un aislamiento, ya que por el método de Kondo se amplificó complejo *mec* clase B, pero ningún complejo *mec* por el método de Zhang, sin embargo por ambos métodos se logró la detección del complejo *ccr* tipo 2. De igual forma, un aislamiento solo tipificó complejo *mec* clase B por la metodología de Zhang y amplificó complejo *ccr* tipo 2 por ambas metodologías. A pesar de ello, los aislamientos pueden ser catalogados como tipo IV, aunque el resultado solo es corroborado por una metodología.

Un aislamiento no tipificó complejo *mec* por ninguna de las dos metodologías, pero amplificó complejo *ccr* tipo 2 por ambos métodos y además complejo *ccr* tipo 5 por el método de Kondo. Un aislamiento, solo amplificó complejo *ccr* 2 por el método de Kondo. Finalmente, dos aislamientos tipificaron complejo *mec* clase A, pero no complejo *ccr*, esto por ambas metodologías (Tabla 13).

Tabla 13. Combinaciones de complejo *mec* y complejo *ccr*, encontrados en *S. epidermidis*.

| n | Metodología de Zhang <i>et al</i> | | | Metodología de Kondo <i>et al</i> | | |
|----|-----------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Complejo <i>mec</i> | Complejo <i>ccr</i> | Tipo SCC <i>mec</i> | Complejo <i>mec</i> | Complejo <i>ccr</i> | Tipo SCC <i>mec</i> |
| 5 | A | 3 | III | A | 3 | III |
| 32 | B | 2 | IV | B | 2 | IV |
| 3 | A | 1 | Nuevo | A | 1 | Nuevo |
| 1 | A | 5 | Nuevo | A | 5 | Nuevo |
| 1 | A | 1+2 | II var | A | 1+2 | II var |
| 5 | B | 1+2 | I var/IV var | B | 1+2 | I var/IV var |
| 1 | A | 2+3 | II/III | A | 2+3 | II/III |

| | | | | | | |
|---|---|-----|-------|---|-------|------------------|
| 7 | A | 3 | III | A | 3+5 | III var |
| 5 | B | 2 | IV | B | 2+5 | IV var |
| 2 | A | 1+5 | Nuevo | A | 1+4+5 | VIII var |
| 2 | A | 2 | II | A | 2+4 | II var/VIII var |
| 1 | A | 3 | III | A | 3+4 | III var/VIII var |
| 1 | B | 2 | IV | B | 2+4 | IV var/VI var |
| 1 | - | 2 | NT | B | 2 | IV |
| 1 | B | 2 | IV | - | 2 | NT |
| 1 | - | 2 | NT | - | 2+5 | NT |
| 1 | - | - | NT | - | 2 | NT |
| 2 | A | - | NT | A | - | NT |

Var: variante; NT: no tipificable.

En los aislamientos de *S. haemolyticus* que contenían el gen *mecA* (55 aislamientos) solo a ocho aislamientos (14.5 %) pudo asignársele un tipo de SCC*mec* según lo descrito para *S. aureus*; los ocho aislamientos (6.6 %) presentaron SCC*mec* tipo V (*ccr* tipo 5, clase *mec* C2). Sin embargo, esto solo pudo ser corroborado por ambas metodologías para seis aislamientos, ya que dos de los ocho aislamientos amplificaron complejo *ccr* tipo 5 solo por la metodología de Kondo. No se detectó el subtipo V.1 para los aislamientos de SCC*mec* tipo V.

Cuatro aislamientos más (7.3 %) amplificaron complejo *mec* clase C2; de ellos, un aislamiento amplificó además, los complejos *ccr* tipos 1, 2 y 5, y tres amplificaron complejos *ccr* tipos 1 y 5, y el complejo *ccr* tipo 4 por la metodología de Kondo. Cabe señalar que la amplificación del complejo *mec* clase C2 solo pudo determinarse por la metodología de Kondo, ya que el método de Zhang no contempla la detección del mismo.

Los aislamientos restantes (43, 78.1 %) no amplificaron complejo *mec* por ninguna de las metodologías utilizadas, sin embargo, entre estos aislamientos, uno amplificó complejo *ccr* tipo 5, y 12 aislamientos el complejo *ccr* tipo 4. El resto de los aislamientos (30/43, 70.5 %) no amplificó complejo *ccr* ni complejo *mec* por ninguna de las dos metodologías (Tabla 14).

Tabla 14. Combinaciones de complejo *mec* y complejo *ccr*, detectados en *S. haemolyticus*.

| n | Metodología de Zhang <i>et al</i> | | | Metodología de Kondo <i>et al</i> | | |
|----|-----------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Complejo <i>mec</i> | Complejo <i>ccr</i> | Tipo SCC <i>mec</i> | Complejo <i>mec</i> | Complejo <i>ccr</i> | Tipo SCC <i>mec</i> |
| 6 | - | 5 | V | C2 | 5 | V |
| 2 | - | - | NT | C2 | 5 | V |
| 1 | - | 1+2+5 | NT | C2 | 1+2+5 | V var/IX var |
| 3 | - | 1+5 | NT | C2 | 1+4+5 | V var/IX var |
| 1 | - | - | NT | - | 5 | NT |
| 12 | - | - | NT | - | 4 | NT |
| 30 | - | - | NT | - | - | NT |

Var: variante; NT: no tipificable.

7.4 Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos.

En *S. epidermidis* se encontró una alta resistencia a antimicrobianos, con porcentajes superiores al 70% en oxacilina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacin, clindamicina y trimetoprim/sulfametoxazol (Tabla 16). Los porcentajes de resistencia a tetraciclina y nitrofurantoína fueron del 12 % y 0 % respectivamente. Tres aislamientos (3.6 %) presentaron resistencia a linezolid. No se encontraron aislamientos resistentes a vancomicina.

Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria y perfil de susceptibilidad a antimicrobianos en los aislamientos de *S. epidermidis*.

| Antibiótico | CMI₅₀ (µg/mL) | CMI₉₀ (µg/mL) | Resistente n (%) | Intermedio n (%) | Susceptible n (%) |
|----------------------------|---|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Oxacilina | >0.5 | >0.5 | 72 (86.7) | NA | 11 (13.3) |
| Vancomicina | 2 | 4 | 0 (0) | 0 (0) | 83 (100) |
| Eritromicina | >4 | >4 | 66 (79.5) | 1 (1.2) | 16 (19.3) |
| Tetraciclina | ≤2 | >8 | 10 (12) | 2 (2.4) | 71 (85.6) |
| Levofloxacina | >2 | >2 | 62 (74.7) | 3 (3.6) | 18 (21.7) |
| Norfloxacina | >8 | >8 | 64 (77.1) | 1 (1.2) | 18 (21.7) |
| Nitrofurantoína | ≤32 | ≤32 | 0 (0) | 0 (0) | 83 (100) |
| Clindamicina | >2 | >2 | 68 (81.9) | 3 (3.6) | 12 (14.5) |
| Trimetoprim/Sulfametoxazol | >2/38 | >2/38 | 60 (72.3) | NA | 23 (27.7) |
| Linezolid | ≤2 | 4 | 3 (3.6) | NA | 80 (96.4) |

NA: No aplica; CMI₅₀: concentración mínima que inhibe al 50 % de los aislamientos; CMI₉₀: concentración mínima que inhibe al 90 % de los aislamientos.

Los aislamientos de *S. haemolyticus* presentaron porcentajes de resistencia similares a *S. epidermidis*, ya que se encontró resistencia por encima del 70% en oxacilina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacina, clindamicina y trimetoprim/sulfametoxazol (Tabla 17). Los porcentajes de resistencia a tetraciclina y nitrofurantoína fueron del 22 % y 0 % respectivamente. Dos aislamientos (3.4 %) presentaron resistencia a linezolid, mientras que el 100% de los aislamientos fue susceptible a vancomicina.

Tabla 16. Concentración mínima inhibitoria y perfil de susceptibilidad a antimicrobianos en los aislamientos de *S. haemolyticus*.

| Antibiótico | CMI₅₀ (µg/mL) | CMI₉₀ (µg/mL) | Resistente n (%) | Intermedio n (%) | Susceptible n (%) |
|----------------------------|---|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Oxacilina | >0.5 | >0.5 | 55 (93.2) | NA | 4 (6.8) |
| Vancomicina | 2 | 2 | 0 (0) | 0 (0) | 59 (100) |
| Eritromicina | >4 | >4 | 53 (89.8) | 0 (0) | 6 (10.2) |
| Tetraciclina | ≤2 | >8 | 13 (22.0) | 2 (3.4) | 44 (74.6) |
| Levofloxacin | >2 | >2 | 54 (91.5) | 1 (1.7) | 4 (6.8) |
| Norfloxacin | >8 | >8 | 53 (89.8) | 0 (0) | 6 (10.2) |
| Nitrofurantoina | ≤32 | ≤32 | 0 (0) | 2 (3.4) | 57 (96.6) |
| Clindamicina | >2 | >2 | 53 (89.8) | 1 (1.7) | 5 (8.5) |
| Trimetoprim/Sulfametoxazol | >2/38 | >2/38 | 45 (76.3) | NA | 14 (23.7) |
| Linezolid | ≤2 | ≤2 | 2 (3.4) | NA | 57 (96.6) |

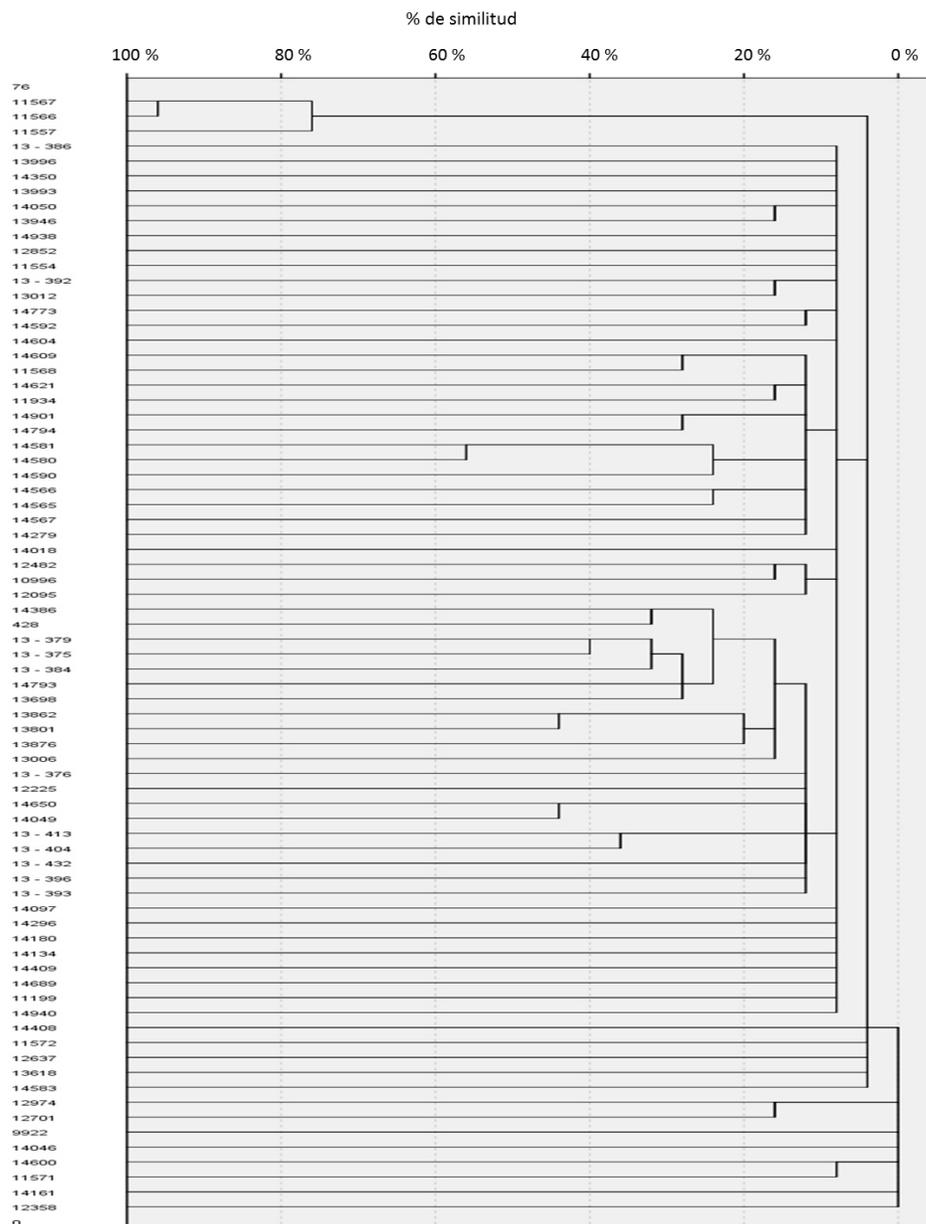
NA: No aplica; CMI₅₀: concentración mínima que inhibe al 50 % de los aislamientos; CMI₉₀: concentración mínima que inhibe al 90 % de los aislamientos.

7.5 Clonalidad de aislamientos.

En los aislamientos de *S. epidermidis*, el corte con la enzima SmaI generó un patrón de restricción compuesto de 7 a 17 fragmentos. En 7 de los 83 aislamientos se generaron de cero a tres fragmentos, por lo que no se consideraron para realizar el análisis. Los aislamientos fueron identificados como *S. epidermidis* por PCR, aunque por pruebas bioquímicas, habían sido identificados dentro de otras especies o bien, como ECN. Se generaron 76 patrones de restricción diferentes, con porcentajes de similitud que del 0 % al

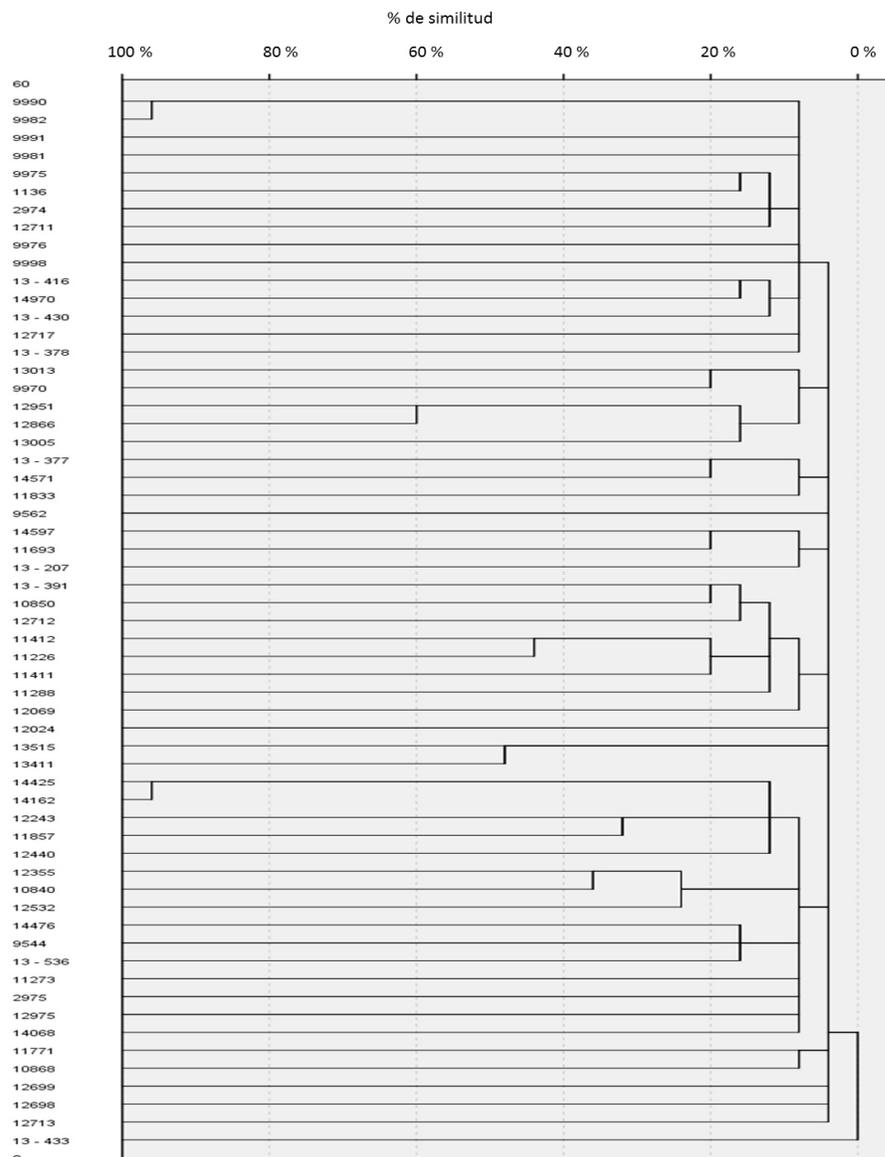
95 %. No hubo detección de clonas. Solamente dos aislamientos presentaron similitud del 95 % (aislamientos 11567 y 1566), mientras que un tercer aislamiento (aislamiento 11557) presentó similitud del 75 % con los aislamientos anteriores. El resto de los aislamientos presentaron homologías inferiores al 60 % (Figura 6).

Figura 6. Dendrograma de aislamientos de *S. epidermidis*.



En el 100 % de los aislamientos de *S. haemolyticus*, el corte con la enzima SmaI generó un patrón de restricción compuesto de 7 a 15 fragmentos. Se generaron 59 patrones de restricción diferentes, con porcentajes de similitud que del 0 % al 95 %. No hubo detección de clonas. Solamente en dos casos, los aislamientos presentaron homología del 95 % (aislamientos 9990 y 9982, así como los aislamientos 14425 y 14162). El resto de los aislamientos presentaron homologías inferiores al 60 % (Figura 7).

Figura 7. Dendrograma de aislamientos de *S. haemolyticus*.



8. DISCUSIÓN

La identificación de las distintas especies de estafilococos coagulasa negativa es a menudo complicada y laboriosa. Las especies más frecuentemente aisladas, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* son relativamente fáciles de identificar por sistemas bioquímicos comerciales, como ya ha sido demostrado (Kim *et al.*, 2008; Garza-Gonzalez *et al.*, 2010). Lo anterior queda evidenciado en este trabajo, ya que los aislamientos previamente identificados a nivel especie por sistema bioquímico, presentaron una concordancia aceptable ($\kappa = 0.36$) con el método molecular utilizado (PCR) que se consideró como criterio definitivo para la identificación en este trabajo.

En el caso de *S. epidermidis*, el 73.7 % de los aislamientos identificados por pruebas bioquímicas tuvo concordancia con la PCR de identificación, conforme a lo descrito para esta especie (Garza-Gonzalez *et al.*, 2010).

En cuanto a *S. haemolyticus*, el 89.5 % de los aislamientos previamente identificados como *S. haemolyticus* por pruebas bioquímicas, coincidió en la identificación por PCR, es decir, los métodos presentaron mayor concordancia entre sí para esta especie, a diferencia de lo observado en *S. epidermidis*. Lo anterior es concordante con un estudio en donde se evaluó la capacidad de discriminación del sistema Sensititre, comparándolo con un método molecular (Garza-Gonzalez *et al.*, 2010). En este trabajo hubo mayor concordancia en la identificación entre los dos métodos para *S. haemolyticus*.

Se ha reportado que los métodos fenotípicos a menudo presentan poca especificidad por algunas especies de ECN. Esto quedó manifiesto en el proceso de identificación, ya que aislamientos que fueron identificados como especies diferentes a *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* por el método fenotípico, fueron identificadas como tales por el método de PCR.

Aunado a los hallazgos anteriores, 20 aislamientos no pudieron ser identificados como *S. epidermidis* o *S. haemolyticus* por el método molecular, a pesar de que algunos aislamientos de este grupo ya habían sido identificados como tales por el método fenotípico. Lo anterior muestra claramente que la identificación por métodos fenotípicos presenta altos porcentajes de correlación, aún dista de ser concluyente.

Se han reportado porcentajes altos de resistencia a meticilina en especies de ECN (mayores a 70 %). En este estudio se encontraron valores similares, ya que el porcentaje global de resistencia a meticilina, determinado por el método fenotípico fue de 84.3 %. Particularmente, en *S. epidermidis* el porcentaje de resistencia fue de 87.2 %, mientras que en *S. haemolyticus* fue de 93.2 %. Lo anterior concuerda con estudios en los que el porcentaje de resistencia a meticilina en *S. haemolyticus* es superior al encontrado en *S. epidermidis* (Wisplinghoff *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2012).

La resistencia a meticilina fue corroborada por dos metodologías de PCR basándose en la presencia del gen *mecA*, cuyo producto, la proteína PB2a es la responsable de la resistencia a meticilina. En ambas metodologías se obtuvo amplificación del gen *mecA* en todos los aislamientos que presentaron resistencia fenotípica. De igual manera, el gen no fue amplificado en la mayoría de los aislamientos que fenotípicamente fueron

sensibles a meticilina. La excepción fueron dos aislamientos de *S. epidermidis* que amplificaron el gen *mecA* por ambas metodologías, pero que fenotípicamente mostraron sensibilidad a meticilina. Esto ya se ha reportado en algunas cepas y se debe principalmente a que no se produce una PBP2a funcional, por lo que a pesar de encontrarse presente el gen no hay una expresión fenotípica en el aislamiento (Swenson and Tenover, 2005; Barros *et al.*, 2012).

Conforme a lo descrito en diversos reportes en donde se analizan aislamientos de *S. epidermidis*, se encontró una alta prevalencia del SCC*mec* tipo IV en esta especie (44.4 %), particularmente el SCC*mec* tipo IVa (Wisplinghoff *et al.*, 2003; Jamaluddin *et al.*, 2008; Garza-Gonzalez *et al.*, 2010). Estos hallazgos han sido reportados tanto en aislamientos procedentes de pacientes hospitalizados, así como de portadores sanos. En un estudio en 2003 en el que se analizaron 44 aislamientos clínicos, se reportó una frecuencia del 36% del SCC*mec* tipo IV (Wisplinghoff *et al.*, 2003); mientras que en otro estudio en pacientes sanos se encontró una frecuencia del 57 % del SCC*mec* IV (Jamaluddin *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en este estudio.

Diversos reportes indican que *S. epidermidis* es un reservorio del SCC*mec* tipo IV y que dicho tipo de SCC*mec* es fácilmente transferido a *S. aureus*. En un estudio realizado por Wisplinghoff *et al* (Wisplinghoff *et al.*, 2003) se sugiere la probable transmisión de información genética de cepas de *S. epidermidis* a cepas de *S. aureus* (particularmente el SCC*mec* tipo IV). Lo anterior puede derivar en un aumento en la resistencia a antibióticos betalactámicos en *S. aureus*, ya que las proporciones de resistencia a meticilina en *S. aureus* no son tan altas como las que presentan las especies de ECN.

Además, en *S. epidermidis* han sido reportados otros tipos de SCC*mec* con cierta frecuencia. Tal es el caso del SCC*mec* tipo III que ha sido reportado en aislamientos clínicos y de la comunidad (Wisplinghoff *et al.*, 2003; Hanssen and Sollid, 2007).

El tamaño de los diversos SCC*mec* se ha asociado con su facilidad para diseminarse. A diferencia de la transmisión del SCC*mec* tipo IV cuyo tamaño (24 kb) permite una amplia diseminación (Berglund and Soderquist, 2008); el SCC*mec* tipo III es el de mayor tamaño (67 kb) que se ha reportado a la fecha y no se ha evidenciado su propagación. En nuestro estudio se detectó el SCC*mec* tipo III en cinco aislamientos (6.9 %). La importancia de una probable diseminación del SCC*mec* radica en que dicho elemento porta genes de resistencia a fármacos adicionales a *mecA* como la resistencia a tetraciclina, eritromicina y espectinomicina. Esto suma relevancia al hallazgo, ya que podría haber transferencia horizontal de información genética.

Otro hallazgo importante es la diversidad de combinaciones de complejo *mec* y complejo *ccr* encontradas en *S. epidermidis*, ya que en este estudio solamente se definieron dos tipos de SCC*mec* (IV y III); los demás aislamientos corresponden a variantes de tipos de SCC*mec*, a combinaciones que no corresponden a ninguno de los once tipos de SCC*mec* reportados a la fecha o bien a aislamientos cuyo SCC*mec* no pudo tipificarse.

Las variantes de tipos de SCC*mec* fueron definidas como tales cuando el aislamiento presenta una combinación de complejo *mec* y de complejo *ccr* que corresponde a algún tipo de SCC*mec*, pero que además presenta uno o más complejos *ccr* que lo convierten en variante del tipo de SCC*mec* asignado. Tal es el caso de un aislamiento que presentó la combinación complejo *mec* clase A y amplificó complejo *ccr* 1

y 2. La combinación de complejo *mec* clase A y complejo *ccr* tipo 2 resulta en la asignación del SCC*mec* tipo II para ese aislamiento. Sin embargo, al amplificar el complejo *ccr* tipo 1, se considera variante del SCC*mec* tipo II, ya que la combinación complejo *mec* clase A y *ccr* tipo 1 no corresponden a ningún tipo de SCC*mec*.

Las distintas combinaciones pueden generar más de un SCC*mec* posible y por tanto más de una variante, como en el caso de seis aislamientos donde se amplifica complejo *mec* clase B y complejo *ccr* tipos 1 y 2; en este caso se generan SCC*mec* tipos I y IV haciendo la combinación correspondiente, y por tanto el complejo *ccr* adicional amplificado lo convierte en una variante. Esto ya ha sido reportado con anterioridad y se han definido como variantes o bien, pueden definirse como combinaciones nuevas (Zong *et al.*, 2011). El problema de tal clasificación radica en que se desconoce si los complejos *ccr* amplificados se encuentran dentro de un mismo SCC*mec*, ya que se han reportado elementos con más de un complejo *ccr* (Hanssen and Sollid, 2007; Ruppe *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2011). Además, se conocen diversos SCC no *mec* que pudieran estar presentes, ya que estos elementos también portan complejos *ccr* (Hanssen and Sollid, 2007; Ruppe *et al.*, 2009).

Tanto para los aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* se presentaron discrepancias entre ambos métodos utilizados. La discrepancia más notable es en la detección del complejo *ccr* tipo 4 y tipo 5. En el caso del complejo *ccr* tipo 4, solo es detectado por la metodología de Kondo *et al.*, mientras que la de Zhang *et al.*, la omite puesto que dicha metodología solo detecta los SCC*mec* tipos I al V y ninguno de ellos posee el complejo *ccr* tipo 4.

En el caso del complejo *ccr* tipo 5, hay una mayor cobertura por el método de Kondo (por esta metodología se amplificó el complejo *ccr* tipo 5 en 29 aislamientos, mientras que por la metodología de Zhang *et al*, se amplificó el complejo *ccr* tipo 5 en solo 13 aislamientos) ya que los iniciadores utilizados en el presente estudio contienen una modificación hecha por Ruppé *et al* (Ruppe *et al.*, 2009) que le permite amplificar alotipos del complejo *ccr* tipo 5 que fueron reportados posteriormente a la publicación de la metodología de Kondo *et al*. Con ello queda evidenciado una vez más la gran diversidad de los elementos que conforman el SCC*mec* en los ECN.

A pesar de lo anterior se ha demostrado efectividad de las metodologías utilizadas en la tipificación del SCC*mec* en ECN, ya que fueron diseñadas originalmente para la tipificación en *S. aureus*. Sin embargo es recomendable realizar la tipificación de complejo *mec* y complejo *ccr* de manera individual cuando se trata de ECN, ya que hay metodologías como la desarrollada por Oliveira *et al* (Oliveira and de Lencastre, 2002) que basan la tipificación del SCC*mec* en la detección de loci específicos en las regiones J. Sin embargo, esto no es recomendable para los ECN puesto que la diversidad de elementos es muy grande y estos loci pudieran estar presentes o no dentro de las regiones J, y ya que la tipificación se basa en la presencia del complejo *mec* y el complejo *ccr*, esto puede dar lugar a interpretaciones erróneas o a la amplificación de más de un loci, suponiendo entonces la presencia de más de un tipo de SCC*mec* (Mombach Pinheiro Machado al., 2007; Ternes *et al.*, 2013) Ya se ha manifestado la necesidad de contar con un esquema de tipificación exclusivo para ECN (Ternes *et al.*, 2013); sin embargo, esto puede no ser práctico ya que la diversidad de los elementos en los ECN es muy grande y por tanto sería sumamente difícil el poder contar con un método definitivo.

La amplia diversidad de elementos genéticos en ECN propicia el hallazgo de aislamientos no tipificables en ECN, sobre todo en la detección del complejo *ccr*. Una debilidad de las metodologías múltiple generalmente utilizadas es que detectan complejos de genes que codifican las recombinasas, mas no genes individuales de recombinasas. En el caso de los complejos *ccr* 1 a 4 esto es importante, ya que los iniciadores amplifican combinaciones específicas de recombinasas. Sería importante hacer la búsqueda de alotipos individuales de recombinasas ya que permitiría la dilucidación práctica de algunos de los genes presentes.

Se han reportado aislamientos no tipificables en el complejo *ccr* ya que existen SCC*mec* sin complejo *ccr*. Esto pudiera estar sucediendo en los aislamientos que no tipifican complejo *ccr*. En el caso de los aislamientos no tipificables en complejo *mec*, se ha descrito que *mecA* puede ser transferido de manera independiente del SCC*mec*, acarreado por secuencias de inserción (Zong, 2013). Tal es el caso de la IS431, que puede formar un transposon compuesto que contiene a *mecA*. Lo anterior ha sido evidenciado al encontrar repeticiones directas de 8 pares de bases en los extremos del transposon, ya que en el complejo *mec* clase C, a pesar de contar con las IS431, no presentan las repeticiones, lo que sugiere la introducción de las IS en tándem.

En *S. haemolyticus* el SCC*mec* frecuentemente asociado es el tipo V, tanto en comunidad como en aislamientos clínicos (Ruppe *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2012) . Conforme a ello, el único SCC*mec* encontrado en los aislamientos de *S. haemolyticus* fue el tipo V, sin embargo no con la frecuencia que ha sido reportada, ya que existen reportes con frecuencias de hasta 55 % (Barros *et al.*, 2012). Igual que para *S. epidermidis*, de la asociación del SCC*mec* tipo V surge la hipótesis de la transferencia de dicho tipo de

SCC*mec* a *S. aureus*, lo cual ha sido evidenciado por medio de la secuenciación de los SCC*mec* en ambas especies, resultando en una homología superior al 99 % (Berglund and Soderquist, 2008), por lo que es probable la transferencia entre las especies, lo cual implicaría a *S. haemolyticus* como un reservorio del SCC*mec* tipo V.

Un hallazgo destacable es que la mayoría de los aislamientos de *S. haemolyticus* fueron no tipificables tanto para complejo *mec* como para complejo *ccr*. Hasta el momento solo existe un reporte donde se haya encontrado tal cantidad de aislamientos no tipificables en *S. haemolyticus*, ya que Barros *et al* (Barros *et al.*, 2012) reportaron el 43 % (24 aislamientos) de los aislamientos de *S. haemolyticus* como no tipificables. Por lo anterior, es claro que la diversidad de elementos en el genoma de *S. haemolyticus* es muy grande, por lo que la mejor manera de conocer dicha diversidad sería mediante la secuenciación de los mismos.

No se detectaron clonas en los aislamientos de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* por lo que se descarta la diseminación de clonas en los dos hospitales. Las infecciones por estos agentes se asociaron a la propia microbiota de los pacientes, que puede causar infección, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos.

En *S. epidermidis*, la ausencia de clonas y la alta prevalencia del SCC*mec* tipo IV encontrada en el estudio, sugiere una vez más la transferencia horizontal de genes entre las especies de estafilococos. A su vez, remarca la importancia de *S. epidermidis* como un reservorio del SCC*mec* tipo IV.

De igual manera, en *S. haemolyticus* se encontró una amplia diversidad genética. En esta especie se ha descrito una alta plasticidad del genoma, lo que produce una cantidad

importante de rearrreglos y mutaciones; también se ha descrito la presencia de hasta 82 secuencias de inserción en el genoma (Barros *et al.*, 2012). Todo lo anterior contribuye a la diversidad de la especie. En 2012, Bouchami *et al* (Bouchami *et al.*, 2012), reportaron un alto nivel de clonalidad en aislamientos clínicos de *S. haemolyticus*, los cuales se agruparon en cuatro clonas principales. Es importante tomar en cuenta que *S. haemolyticus* forma parte de la microbiota normal y es de donde frecuentemente se originan las infecciones por esta especie.

Otro hallazgo que sustenta la transferencia horizontal de genes, es el perfil de susceptibilidad de los aislamientos de ambas especies, ya que es similar en todos los aislamientos, con resistencia superior al 70% a oxacilina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacina, clindamicina y trimetoprim/sulfametoxazol; mientras que existe alta susceptibilidad a eritromicina y tetraciclina.

Particularmente en *S. haemolyticus*, se ha reportado una alta resistencia a antibióticos, mayor a la presente en *S. epidermidis*. Diversos estudios evidencian la resistencia a eritromicina y ciprofloxacina (Bouchami *et al.*, 2012). Asimismo, Tabe *et al* (Tabé *et al.*, 1998) reportaron un aumento en la CMI de vancomicina a 4 µg/mL en el 56 % de los aislamientos (Tabé *et al.*, 1998), lo que los clasifica como intermedios a vancomicina. Sin embargo, en nuestro estudio, el 100 % de los aislamientos de *S. haemolyticus* y de *S. epidermidis* es sensible a vancomicina.

9. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 83 aislamientos como *S. epidermidis* y 59 aislamientos como *S. haemolyticus* mediante PCR.
2. El porcentaje de resistencia a meticilina encontrado en *S. haemolyticus* fue mayor que el encontrado en *S. epidermidis*, con un 93.2 % y un 84.3 % respectivamente.
3. Se amplificó el gen *mecA* en todos los aislamientos fenotípicamente resistentes a meticilina.
4. Se encontró una alta frecuencia del SCC*mec* tipo IV en *S. epidermidis* (44.4 %), por lo que dicha especie es un probable reservorio del mismo.
5. En *S. haemolyticus* solo se encontró el SCC*mec* tipo V, con baja frecuencia (6.6 %).
6. La mayoría de los aislamientos de *S. haemolyticus* fueron no tipificables (78.1 %), indicando la probable existencia de nuevas estructuras del SCC*mec*.
7. Los aislamientos de ambas especies presentaron resistencia superior al 70% en oxacilina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacina, clindamicina y trimetoprim/sulfametoxazol; mientras que existe alta susceptibilidad a eritromicina y tetraciclina.
8. No se identificaron clonas en ninguna de las dos especies analizadas.

10. LITERATURA CITADA

- Barber M. 1961. *Methicillin-resistant staphylococci*. J Clin Pathol 14: p. 385-93.
- Barros EM, Ceotto H, Bastos MCF, dos Santos KRN. 2012. *Staphylococcus haemolyticus as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes*. J Clin Microbiol 50(1): p. 166-8.
- Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Soderquist B, Hiramatsu K. 2008. *Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain isolated in Sweden*. Antimicrob Agents Chemother 52(10): p. 3512-6.
- Berglund C, Soderquist B. 2008. *The origin of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome mec between methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 14(11): p. 1048-56.
- Bouchami O, Ben Hassen A, de Lencastre H, Miragaia M. 2012. *High prevalence of mec complex C and ccrC is independent of SCCmec type V in Staphylococcus haemolyticus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31(4): p. 605-14.
- Burnie JP, Naderi-Nasab M, Loudon KW, Mathews RC. 1997. *An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital-acquired infection*. J Clin Microbiol 35(7): p. 1746-50.
- CLSI, M02-A11. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Eleventh Edition.
- CLSI, M100-S24. 2014. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twenty-Second Informational Supplement.
- Chung M, De Lencastre H, Matthews P, Tomasz A. 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): p. 189-98.

- Davey ME, O'Toole GA. 2000. *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4): p. 847-867.
- de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NPJ, 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): p. 382-8.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clinical Microbiology Reviews 15(2): p. 167-193.
- Dunne WM. 2002. *Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?* Clinical Microbiology Reviews 15(2): p. 155-166.
- Eriksen KR. 1961. *Celbenin-resistant staphylococci*. Ugeskr Laeger 123: p. 384-6.
- Forbes BA, Weissfeld AS. 2007. *Staphylococcus, Micrococcus and Similar Organisms*, in *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Mosby Elsevier. p. 254-261.
- Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, Sollid JE. 2009. *Biofilm formation by Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 47(4): p. 1172-80.
- Garcia P. 2004. *Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia*. Journal of Medical Microbiology 53(1): p. 67-72.
- Garza-Gonzalez E, Lopez D, Pezina C, Muruet W, Bocanegra-García V, Muñoz I, Ramírez C, Llaca-Diaz JM. 2010. *Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance*. J Med Microbiol 59(Pt 3): p. 323-9.
- Garza-Gonzalez E, Morfin-Otero R, Macedo P, Gonzalez GM, Llaca-Diaz JM, Perez-Gomez R, Rodriguez-Noriega E. 2010. *Evaluation of Sensititre plates for identification of clinically relevant coagulase-negative staphylococci*. J Clin Microbiol 48(3): p. 963-5.
- Ghebremedhin B, Layer F, Kong W, 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): p. 1019-25.
- Gill SR. 2005. *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain*. J Bacteriol 187(7): p. 2426-38.

- Hanssen AM, Ericson-Sollid JU. 2006. *SCCmec in staphylococci: genes on the move*. FEMS Immunol Med Microbiol 46(1): p. 8-20.
- Hanssen AM, G. Kjeldsen, 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): p. 285-96.
- Hanssen AM, 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): p. 1671-7.
- Hartman BJ, Tomasz A. 1984. *Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 158(2): p. 513-6.
- Heikens E, Fler A, Paauw A, Florijn A, 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): p. 2286-90.
- Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. 2011. *Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR*. J Clin Microbiol 49(10): p. 3627-31.
- Ibrahim S. 2008. *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strains from bacteraemic patients*. Clin Microbiol Infect 14(11): p. 1020-7.
- Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula AM, Lyytikäinen O, Jagerroos H, Broas M, Vuopio-Varkila J. 2009. *Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility*. J Clin Microbiol 47(1): p. 32-7.
- IWG-SCC. 2008. *SCCmec Background. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements*. Available from: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html.
- IWG-SCC. 2009. *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrob Agents Chemother 53(12): p. 4961-7.
- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, 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): p. 1323-36.

- Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. 1999. *Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315*. Antimicrob Agents Chemother 43(6): p. 1449-58.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. 2004. *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC*. Antimicrob Agents Chemother 48(7): p. 2637-51.
- Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K. 2008. *Extreme genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strains disseminated among healthy Japanese children*. J Clin Microbiol 46(11): p. 3778-83.
- John JF, Harvin AM. 2007. *History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents*. Ther Clin Risk Manag 3(6): p. 1143-52.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. 2000. *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 44(6): p. 1549-55.
- Katayama Y, Zhang HZ, Hong D, Chambers HF. 2003. *Jumping the Barrier to β -Lactam Resistance in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 185(18): p. 5465-5472.
- Kim M, Heo SR, Choi SH, Kwon H, Park JS, Seon MW, Lee DH, Park KU, Song J, Kim EC. 2008. *Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci*. BMC Microbiol 8: p. 233.
- Kloos WE, Bannerman TL. 1994. *Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci*. Clin Microbiol Rev 7(1): p. 117-40.
- Kloos WE, Schleifer KH. 1975. *Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species*. J Clin Microbiol 1(1): p. 82-8.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth B, Etienne J, 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): p. 264-74.
- Kristof K, Kocsis E, Szabó D, Kardos S, Cser V, Nagy K, Hermann P. 2011. *Significance of methicillin-teicoplanin resistant Staphylococcus haemolyticus in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30(5): p. 691-9.

- Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, Konig W, Konig B. 2006. *Comparative study using various methods for identification of Staphylococcus species in clinical specimens*. J Clin Microbiol 44(8): p. 2824-30.
- Longauerova A. 2006. *Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections*. Bratisl Lek Listy 107(11-12): p. 448-52.
- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. 2002. *Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains*. Antimicrob Agents Chemother 46(4): p. 1147-1152.
- McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. 2008. *Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management*. J Pharm Pharmacol 60(12): p. 1551-71.
- Miragaia M. 2002. *Molecular Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis Clones: Evidence of Geographic Dissemination*. J Clin Microbiol 40(2): p. 430-438.
- Mombach Pinheiro Machado AB, Reiter KC, Paiva RM, 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): p. 1328-33.
- Oliveira DC, 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): p. 2155-61.
- Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. 2006. *Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI*. Antimicrob Agents Chemother 50(10): p. 3457-9.
- Otto M. 2012. *Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections*. Semin Immunopathol 34(2): p. 201-14.
- Pereira PM. 2014. *Staphylococcus haemolyticus disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil*. Diagn Microbiol Infect Dis 78(1): p. 85-92.
- Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. 2001. *Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sodA gene as a target*. J Clin Microbiol 39(12): p. 4296-301.

- Ruppe E, Barbier F, Mesli Y, Maiga A, Cojocar R, Benkhalfat M, Benchouk S, Hassaine H, Maiga I, Diallo A, Koumare AK. 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): p. 442-9.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala J, Charlier P. 2008. *The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis.* FEMS Microbiol Rev 32(2): p. 234-58.
- Shah MM. 2007. *dnaJ gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus Staphylococcus.* Int J Syst Evol Microbiol 57(Pt 1): p. 25-30.
- Sharma M, Riederer K, Johnson LB, Khatib R. 2001. *Molecular analysis of coagulase-negative Staphylococcus isolates from blood cultures: prevalence of genotypic variation and polyclonal bacteremia.* Clin Infect Dis 33(8): p. 1317-23.
- Shittu A. 2004. *Isolation and molecular characterization of multiresistant Staphylococcus sciuri and Staphylococcus haemolyticus associated with skin and soft-tissue infections.* Journal of Medical Microbiology 53(1): p. 51-55.
- Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. 2011. *Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 55(8): p. 3765-73.
- Swenson JM, Tenover FC. 2005. *Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of mecA in Staphylococcus spp.* J Clin Microbiol 43(8): p. 3818-23.
- Tabé Y, Nakamura A, Oguri T, Igari J. 1998. *Molecular characterization of epidemic multiresistant Staphylococcus haemolyticus isolates.* Diagn Microbiol Infect Dis 32(3): p. 177-83.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.* J Clin Microbiol 33(9): p. 2233-9.
- Ternes YM, Lamaro-Cardoso J, Porfírio-André MC, Porfírio-Pessoa V. 2013. *Molecular epidemiology of coagulase-negative Staphylococcus carriage in neonates admitted to an intensive care unit in Brazil.* BMC Infect Dis 13: p. 572.

- Widerstrom M, Wistrom J, Sjostedt A, Monsen T. 2012. *Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31(1): p. 7-20.
- Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. 2003. *Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant Staphylococcus epidermidis isolates*. Antimicrob Agents Chemother 47(11): p. 3574-9.
- Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. *Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance*. FEMS Microbiol Rev 32(2): p. 361-85.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. 2009. *Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 53(2): p. 531-40.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, 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): p. 5026-33.
- Ziebuhr W, Henning S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. 2006. *Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen*. Int J Antimicrob Agents 28 Suppl 1: p. S14-20.
- Zong Z, Peng C, Lu X. 2011. *Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates*. PLoS One 6(5): p. e20191.
- Zong Z. 2013. *Characterization of a complex context containing mecA but lacking genes encoding cassette chromosome recombinases in Staphylococcus haemolyticus*. BMC Microbiol 13: p. 64.

ANEXO I

Preparación de reactivos y soluciones.

Bromuro de etidio, 0.5 mg/mL (Solución stock).

Diluir 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4° C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio, 2 µg/mL.

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock y 249 mL de agua ultrapura). Almacenarse en la oscuridad.

Buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2

Disolver 0.4267 g de K_2HPO_4 , 0.3470 g de KH_2PO_4 en agua destilada, ajustar pH 7.2 y aforar a 500 mL.

Buffer EC

Disolver 29.2 g de NaCl, 1 g de deoxicolato de sodio, 2.5 g de laurilsarcosina de sodio, 2.5g de brij 58, 5 mL de Tris-base 1 M pH 8, 100 mL EDTA 0.5 M pH 8 en agua destilada. Aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

Solución EC-lisis

Disolver 0.1 mg de lisozima, 5 µL de lisostafina 10 mg/mL, 10 µL de RNAsa 5 mg/mL en 1 mL de EC.

EDTA 500 mM.

Disolver 18.62 g de EDTA en 100 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.

Buffer ES.

Disolver 93.1 g de EDTA en 400mL de agua destilada, ajustar el pH a 9 con \approx 20 g de NaOH, añadir 0.5 g de sarcosyl. Aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

Solución ESP.

Añadir 1 mg de Proteinasa K a 1 mL de ES.

Gel de agarosa al 2 %.

Disolver 4 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregar 20 μ L de bromuro de etidio 2 μ g/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

Jugo azul 5X (Buffer de carga para electroforesis).

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE 1X pH 8 y aforar a 10 mL.

NaOH 0.1 M.

Disolver 0.4 g de NaOH en 100 mL de agua destilada.

PIV.

Disolver 29.22 g de NaCl en 250 mL de Tris-base 1 M pH 8 en agua destilada, aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 10X.

Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua destilada, ajustar a pH 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 0.5X.

Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1L con agua destilada.

TE 1X (Tris-HCl 500 mM pH 8, EDTA 1 mM).

Mezclar 10 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8 y 1 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl 500 mM.

Disolver 30.3 g de Tris base en 300 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

ANEXO II

Resultados por aislamiento de *S. epidermidis*.

| Aislamiento | Origen ¹ | Metodología de Zhang et al. ² | | | Metodología de Kondo et al. ³ | | | Perfil de Susceptibilidad ⁴ | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------|--|-----------|----------|--|-----------|----------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | mecA | Clase mec | Tipo ccr | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | FOX | NOR | CLI | TET | LEV | LZD | NIT | SXT | ERY | OXA |
| 13 - 432 | GDL | Neg | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 13 - 413 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | S | S | I | S | S | S | S | S | R | S |
| 13 - 404 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 398 | GDL | Pos | A | 2 | Pos | A | 2 | II | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 393 | GDL | Neg | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 13 - 392 | GDL | Pos | A | 3 | Pos | A | 3 | III | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 388 | GDL | Pos | A | 3 | Pos | A | 3+5 | III | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 384 | GDL | Pos | B | 1+2 | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 379 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 376 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 13 - 375 | GDL | Pos | B | 1+2 | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14640 | HU | Pos | A | 3 | Pos | A | 3 | III | R | R | S | S | R | S | S | S | R | S |
| 14938 | HU | Neg | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 14901 | HU | Pos | B | 2 | Pos | B | 2+4 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14794 | HU | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14793 | HU | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14773 | HU | Pos | B | 1+2 | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | R | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14689 | HU | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14650 | HU | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14621 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14609 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14604 | GDL | Pos | A | NT | Pos | A | NT | NT | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S |
| 14600 | GDL | Pos | A | 3 | Pos | A | 3 | III | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14592 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | I | S | S | R | R | S |
| 14590 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14583 | GDL | Pos | A | 3 | Pos | A | 3+5 | III | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14581 | GDL | Pos | NT | NT | Pos | NT | 2 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14580 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14567 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14566 | GDL | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14565 | GDL | Pos | A | 3 | Pos | A | 3+5 | III | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 14409 | HU | Pos | B | 2 | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S |

| Aislamiento | Origen ¹ | Metodología de Zhang et al ² | | | Metodología de Kondo et al ³ | | | Perfil de Susceptibilidad ⁴ | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------|---|-----------|----------|---|-----------------|-----------|--|--------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | meca | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | meca | Clase mec | Tipo ocr | SCCmec | FOX | NOR | CLI | TET | LEV | LZD | NIT | SXT | ERY | OXA |
| 14408 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 14386 | HU | Neg | NA | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 14350 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2+5 | IV var/Nuevo | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 14296 | HU | Pos | NT | 2 | NT | NT | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14279 | HU | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | I var/IV var | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14180 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14161 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14134 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14097 | HU | Pos | A | 1+2 | Nuevo/II var | Nuevo/II var | Pos | A | 1+2 | Nuevo/II var | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 14050 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2+5 | IV var/Nuevo | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 14049 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 14046 | HU | Neg | NA | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 14018 | HU | Pos | A | 3 | III | III | Pos | A | 3+5 | III var/Nuevo | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13996 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13993 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13946 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13876 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13862 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13801 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13698 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13618 | GDL | Neg | NA | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 13012 | HU | Neg | NA | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 13006 | HU | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | I var/IV var | Pos | B | 1+2 | I var/IV var | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12974 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2+5 | IV var/Nuevo | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12852 | HU | Pos | A | 2 | II | II | Pos | A | 2+4 | II var/ VIII var | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12708 | GDL | Pos | A | 1 | Nuevo | Nuevo | Pos | A | 1 | Nuevo | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12701 | GDL | Pos | A | 3 | III | III | Pos | A | 3 | III | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12694 | GDL | Pos | A | NT | NT | NT | Pos | A | NT | NT | S | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12637 | HU | Pos | A | 3 | III | III | Pos | A | 3+4 | III var/ VIII var | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 12482 | HU | Pos | B | 2 | IV | IV | Pos | B | 2 | IV | R | I | R | R | S | S | R | R | S |
| 12358 | HU | Neg | NA | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | R | R | S |
| 12242 | HU | Pos | A | 2+3 | II var/ III var | II var/ III var | Pos | A | 2+3 | II var/ III var | R | R | R | S | S | S | R | R | S |

| Aislamiento | Origen ¹ | Metodología de Zhang et al ² | | | Metodología de Kondo et al ³ | | | Perfil de Susceptibilidad ⁴ | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------|---|-----------|----------|---|------|-----------|--|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | FOX | NOR | CLI | TET | LEV | LZD | NIT | SXT | ERY | OXA | VAN |
| 12225 | HU | Pos | B | 2 | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | S | I | R | S | S | R | S | R | S |
| 12095 | HU | Pos | B | 2 | IV | Pos | B | 2 | IV | R | S | R | S | S | S | S | S | R | R | S |
| 11856 | HU | Pos | A | 5 | Nuevo | Pos | A | 5 | Nuevo | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11834 | HU | Neg | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | R | R | S | S | S | R | S | R | S |
| 11858 | HU | Pos | A | 1 | Nuevo | Pos | A | 1 | Nuevo | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | S |
| 11572 | GDL | Pos | NT | 2 | NT | Pos | NT | 2+5 | NT | R | R | S | S | R | S | S | R | S | R | S |
| 11571 | GDL | Pos | B | 2 | IV | Pos | B | 2 | IV | R | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S |
| 11568 | GDL | Pos | B | 2 | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11567 | GDL | Pos | A | 3 | III | Pos | A | 3+5 | III var/Nuevo | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11566 | GDL | Pos | A | 3 | III | Pos | A | 3+5 | III var/Nuevo | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 11557 | GDL | Pos | A | 3 | III | Pos | A | 3+5 | III var/Nuevo | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11554 | GDL | Pos | B | 2 | IV | Pos | B | 2+5 | IV var/Nuevo | R | R | R | S | I | S | S | S | I | R | S |
| 11553 | GDL | Pos | A | 1 | Nuevo | Pos | A | 1 | Nuevo | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 11189 | GDL | Pos | A | 3 | III | Pos | A | 3 | III | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 10896 | HU | Neg | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 10842 | HU | Pos | A | 1+5 | Nuevo | Pos | A | 1+4+5 | Nuevo/III var | R | S | R | S | I | S | S | R | R | R | S |
| 9922 | GDL | Pos | B | 2 | IV | Pos | B | 2 | IV | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 9543 | HU | Pos | A | 1+5 | Nuevo | Pos | A | 1+4+5 | Nuevo/III var | R | S | R | S | S | S | S | R | R | R | S |
| 428 | HU | Neg | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S |

¹HU: Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"; GDL: Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"; ^{2,3}Pos: positivo; Neg: negativo; NA: no aplica; NT: no tipificable; var: variante; ⁴FOX: cefoxitina; NOR: norfloxacin; CLI: clindamicina; TET: tetraciclina; LEV: levofloxacina; LZD: linezolid; NIT: nitrofurantoina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; ERY: eritromicina; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina.

ANEXO III

Resultados por aislamiento de *S. haemolyticus*.

| Aislamiento | Metodología de Zhang et al. ² | | | | Metodología de Kondo et al. ³ | | | | Perfil de Susceptibilidad ⁴ | | | | | | | | | | | |
|-------------|--|------|-----------|----------|--|------|-----------|----------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Origen ¹ | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | FOX | NOR | CLI | TET | LEV | LZD | NIT | SXT | ERY | OXA | VAN |
| 13 - 538 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 13 - 433 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | 4 | NT | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 13 - 430 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 13 - 418 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 13 - 391 | GDL | Neg | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 13 - 378 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 13 - 377 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 13 - 207 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 14970 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | 4 | NT | R | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S |
| 14597 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 14571 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 14476 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 14425 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | C2 | 5 | V | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 14162 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | C2 | 5 | V | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 14068 | HU | Pos | NT | 1+2+5 | NT | Pos | C2 | 1+2+5 | Nuevo | R | R | S | S | R | S | S | R | S | R | S |
| 13515 | HU | Neg | NA | NA | NA | Neg | NA | NA | NA | S | R | S | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 13411 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 13013 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 13005 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 12975 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12951 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12866 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | I | R | S | S | R | R | R | S |
| 12717 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12713 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12712 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12711 | GDL | Pos | NT | 5 | NT | Pos | C2 | 5 | V | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12699 | GDL | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12688 | GDL | Pos | NT | 1+5 | NT | Pos | C2 | 1+4+5 | Nuevo | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 12632 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12440 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 12355 | HU | Pos | NT | NT | NT | Pos | NT | NT | NT | R | R | R | I | R | S | S | R | R | R | S |
| 12243 | HU | Pos | NT | 1+5 | NT | Pos | C2 | 1+4+5 | Nuevo | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |

| Aislamiento | Metodología de Zhang et al ² | | | Metodología de Kondo et al ³ | | | Perfil de Susceptibilidad ⁴ | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|-----------|----------|---|------|-----------|--|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | mecA | Clase mec | Tipo ccr | SCCmec | FOX | NOR | CLI | TET | LEV | LZD | NIT | SXT | ERY | OXA | VAN |
| 12069 | GDL | Pos | NT | 5 | NT | C2 | 5 | V | R | R | R | R | I | S | S | S | R | R | S |
| 12024 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11857 | HU | Pos | NT | 1+5 | NT | C2 | 1+4+5 | Nuevo | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 11833 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11771 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | I | R | R | R | S |
| 11693 | HU | Pos | NT | 5 | NT | C2 | 5 | V | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11412 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11411 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 11288 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 11273 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | S |
| 11226 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 10888 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 10850 | HU | Pos | NT | 5 | NT | C2 | 5 | V | R | S | S | R | S | S | S | S | S | R | S |
| 10840 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 9668 | GDL | Pos | NT | NT | NT | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 9691 | GDL | Pos | NT | 5 | NT | C2 | 5 | V | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 9690 | GDL | Pos | NT | NT | NT | NT | 4 | NT | R | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 9692 | GDL | Pos | NT | NT | NT | NT | 4 | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 9691 | GDL | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 9676 | GDL | Neg | NA | NA | NA | NA | NA | NA | S | R | R | S | R | R | S | R | R | R | S |
| 9675 | GDL | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 9670 | GDL | Pos | NT | NT | NT | NT | 4 | NT | R | S | I | R | R | S | I | S | R | R | S |
| 9562 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | 5 | NT | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 9544 | HU | Pos | NT | 5 | NT | C2 | 5 | V | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 2975 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | S |
| 2974 | HU | Pos | NT | NT | NT | NT | NT | NT | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | S |
| 1136 | HU | Neg | NA | NA | NA | NA | NA | NA | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | S |

¹HU: Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"; GDL: Hospital Civil de Guadalupe; ^{2,3}Pos: positivo; Neg: negativo; NA: no aplica; NT: no tificable; var: variante; ⁴FOX: ceftioxima; NOR: norfloxacina; CLI: clindamicina; TET: tetraciclina; LEV: levofloxacina; LZD: linezolid; NIT: nitrofurantoina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; ERY: eritromicina; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina.