



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización fenotípica y molecular de *Staphylococcus*
Coagulasa Negativos aislados de infecciones asociadas a prótesis
articulares.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Brenda Salazar Sáenz



MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

Profesor: Raúl Garza Velasco

VOCAL:

Profesora: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

SECRETARIO:

M. en C. Silvestre Vicente Ortega Peña

1er. SUPLENTE:

Profesor: Luciano Hernández Gómez

2° SUPLENTE:

Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

***Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ), Instituto
Nacional de Rehabilitación***

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Silvestre Vicente Ortega Peña

SUSTENTANTE (S):

Brenda Salazar Sáenz

Índice

	Página
1. Resumen	2
2. Antecedentes	
2.1 Infecciones de prótesis articulares.....	4
2.1.1 Factores de riesgo y manifestaciones clínicas de las IPA.....	5
2.1.2 Clasificación y formas de infección.....	6
2.1.3 Microbiología de las IPA.....	7
2.2 <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.....	7
2.2.1 Importancia clínica de SCN.....	10
2.2.2 Identificación, diagnóstico y tratamiento.....	11
2.2.3 Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de SCN.....	12
2.3 Formación de biopelículas en <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.....	13
2.3.1 Biosíntesis de las biopelículas.....	14
2.3.2 Mecanismos moleculares para la formación de biopelículas en SCN.....	18
2.3.2.1 Operón <i>icaADCB</i>	18
2.3.2.2 Proteína Aap.....	20
2.3.2.3 Proteína Bhp.....	21
2.3.2.4 Proteína Embp.....	22
2.4 Resistencia a oxacilina en SCN.....	22
2.4.1 Cassette estafilocócico cromosomal (<i>SCCmec</i>).....	22

3. Planteamiento del problema.....	28
4. Justificación.....	28
5. Objetivos.....	29
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos particulares.....	29
6. Metodología.....	29
6.1 Tipo de estudio.....	29
6.2 Selección de cepas.....	29
6.3 Identificación y pruebas de sensibilidad.....	30
6.4 Caracterización fenotípica.....	31
6.4.1 Producción de biopelículas in vitro	31
6.4.2 Tratamiento de resultados para caracterización de biopelículas.....	32
6.5 Caracterización genotípica.....	32
6.5.1 Extracción de material genético.....	32
6.5.2 Amplificación del genes.....	33
6.5.3 Condiciones de reacción para amplificación de genes.....	34
7. Resultados.....	37
7.1 Características de las cepas incluidas en el estudio.....	37

7.2 Perfil de resistencia a antibióticos.....	38
7.3 Caracterización fenotípica de biopelículas.....	39
7.4 Caracterización genotípica de biopelículas.....	42
7.4.1 Amplificación de genes relacionados con la biopelícula de <i>S. epidermidis</i>	45
7.4.2 Amplificación del gen <i>mecA</i>	48
8. Discusión.....	51
9. Conclusiones.....	57
10. Referencias.....	58

ABREVIATURAS

Aap	Proteína asociada a adhesión
Agr	Gen accesorio regulador
Bap	Proteína asociada a biopelícula
Bhp	Proteína homóloga a BAP
CENETEC	Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
Embp	Proteína de unión a matriz extracelular
GlcNAc	β -1.6-N-acetilglucosamina
IPA	Infección de prótesis articular
MSCRAMMs	Componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas de matriz adhesiva
ORF	Marco abierto de lectura
PA	Prótesis articular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Productores débiles
PF	Productores fuertes
PIA	Polisacárido de adhesión intracelular
PSM	Modulinas solubles en fenol
QS	Quorum sensing
NP	No productores
PNAG	poli-N-acetilglucosamina
SCCmec	Cassete estafilocócico cromosomal
SCN	Staphylococcus coagulasa negativos
TSB	Caldo tripticasa soya
TSB-G	Caldo tripticasa soya suplementado con glucosa

1. Resumen

Introducción. El grupo de los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) ha emergido como uno de los principales agentes etiológicos asociados a las infecciones de prótesis articulares (IPA). El principal factor de virulencia que posee este grupo de microorganismos es su capacidad de formar biopelículas sobre superficies vivas (tejidos del hospedero) e inertes (componentes protésicos). La producción de las biopelículas está regulada por el operón *icaADBC* o por un mecanismo alternativo denominado PIA-independiente, que codifica para tres proteínas: Bhp, Aap y Embp. Además, un problema grave en el tratamiento de los SCN es que presentan una alta resistencia a oxacilina, la cual está determinada por la presencia del gen *mecA* que es transmitido entre cepas de origen nosocomial por medio de un elemento genético móvil conocido como cassette estafilocócico cromosomal (SCCmec).

Objetivo. Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de SCN aisladas de infecciones de prótesis articulares.

Metodología. Se incluyeron 66 cepas clínicas de SCN aisladas de IPA entre enero de 2011 y diciembre de 2015 en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Su identificación y susceptibilidad se obtuvo con el sistema automatizado Vitek 2. La resistencia a oxacilina se confirmó con la amplificación del gen *mecA*. En las cepas *mecA* (+) se tipificó el SCCmec por el cual adquirieron la resistencia. La producción de biopelícula fue detectada fenotípicamente mediante el ensayo semicuantitativo de adherencia con cristal violeta. La caracterización genotípica se realizó amplificando con PCR punto final los genes del operón *icaADBC*, *bhp*, *aap* y *embp*.

Resultados. La especie aislada con mayor frecuencia fue *S. epidermidis* (83%), seguida por *S. hominis* (8%). Las pruebas de susceptibilidad mostraron que *S. epidermis*, *S. hominis* y *S. lugdunensis* fueron las especies con mayor resistencia a antibióticos, principalmente a penicilinas y fluoroquinolonas.

Las cepas mostraron alta resistencia a oxacilina (77%), la cual se correlacionó con la presencia el gen *mecA*. El SCCmec más frecuente fue el tipo IVa que se presentó en el 51%, el IVb en el 2%, el IVc en el 4%, el IVd en el 6% y el V en el 2%; en tanto el 35% de las cepas no se logró determinar. La formación de biopelícula se detectó fenotípicamente en el 45% de las cepas, de las cuales la mitad formaron biopelículas fuertes y las restantes biopelículas débiles. El operón *icaADBC* se encontró en 24% de los aislamientos. El gen *embp* se detectó en 48% de las cepas, el *aap* en el 65% y *bhp* en el 26%.

Conclusiones. *S. epidermidis* fue el principal microorganismo del grupo de los SCN aislado de infecciones de prótesis articulares. Se encontró una alta resistencia a los antibióticos de primera elección, principalmente a penicilinas. El SCCmec tipo IVa, fue el principal mecanismo de transferencia del gen *mecA*. En las cepas productoras de biopelículas, se encontró que el principal mecanismo asociado a su formación es la expresión del operón *icaADCB* y de la vía alternativa el gen *aap*.

2. Antecedentes

2.1 Infecciones de prótesis articulares

Las cirugías ortopédicas pueden involucrar la inserción de dispositivos médicos, tales como el material de osteosíntesis o prótesis articulares (PA), cuya función es la de reparar fracturas o articulaciones desgastadas.¹ Las PA tienen la finalidad de mejorar la movilidad de los pacientes y, con ello, ofrecer una mejor calidad de vida; pero bajo ciertas condiciones pueden infectarse y provocar efectos graves en los pacientes.²

La infección de prótesis articular (IPA) representa la complicación más temida que puede presentarse después de un procedimiento de reemplazo articular (artroplastía), debido a los altos costos que genera su tratamiento y a que puede causar secuelas irreversibles.³ El costo asociado al tratamiento puede ser muy elevado, porque generalmente involucra constantes lavados quirúrgicos y un uso prolongado de antibióticos; además, cuando la infección es persistente, la artroplastía fracasa y se recurre a la remoción completa del material protésico.⁴

En México se ha reportado que la frecuencia de las infecciones relacionadas al reemplazo articular de rodilla es del 0.68% al 1.60%, dependiendo de los factores de riesgo del paciente; análogamente los de cadera ascienden de 0.67% y hasta el 2.4%. Debido a ello, se estima que anualmente se presentan entre 6,000 y 20,000 casos de infecciones asociadas solamente a reemplazo articular de cadera y de rodilla.

En una gran mayoría de infecciones protésicas se requiere de un tratamiento combinado médico-quirúrgico, el cual involucra debridamiento de la zona infectada o retiro de la PA, y terapia antimicrobiana para lograr la erradicación de la infección.⁵ El tratamiento temprano es un elemento decisivo en cuanto a la posibilidad de salvar la artroplastia.⁶

2.1.1 Factores de riesgo y manifestaciones clínicas de las IPA

Existen factores de riesgo para la adquisición de este tipo de infecciones, los cuales se agrupan en dos categorías: los que se basan en evidencias y aquellos que no^{3,5}; pero que presentan una relación directa con este tipo de afección (tabla 1).^{1,4,5}

Tabla 1. Factores de riesgo para infección de prótesis articulares.

Factores de riesgo basados en evidencia	Factores de riesgo sin evidencia
Artritis reumatoide	Bacteremia o candidemia en el año previo a la artroplastia
Heridas superficiales previas a la infección	Episodios previos de IPA en otro sitio anatómico
Obesidad/ <i>Diabetes mellitus</i> tipo II	Falta de integridad de la piel
Tiempo de cirugía >2.5 h	Uso de drogas inyectables
Paciente inmunosuprimido	Infección activa en otro sitio anatómico

Guía de práctica clínica, CENETEC (2013)

Las manifestaciones clínicas de IPA dependen de los factores de virulencia del agente etiológico que las causan, de la forma en que inicia la infección, de la respuesta inmune del hospedero, de la articulación involucrada y de la estructura del tejido blando que rodea la prótesis. Los principales signos clínicos de la IPA son dolor, hinchazón o derrame de líquido articular, eritema o calor alrededor de la articulación, tumefacción y fiebre.^{5,8,10} Aunados a las manifestaciones clínicas, también se toman en cuenta parámetros de laboratorio tales como el aumento en la velocidad de sedimentación globular, leucocitosis y el incremento de la concentración de la proteína C reactiva, debido a que estos pueden indicar la ocurrencia de un proceso infeccioso o inflamatorio.⁴

Una vez que se diagnostica la IPA, se pueden adoptar varios métodos terapéuticos. La selección del tratamiento adecuado depende de los factores del hospedero (edad, movilidad basal, comorbilidades, etc.), virulencia y susceptibilidad antimicrobiana del organismo infectante, duración de la infección, factores inherentes a la prótesis (estabilidad del implante, de cirugías o infecciones previas) y la expectativa del paciente.^{5,9,10}

2.1.2 Clasificación y formas de infección

Un implante articular se puede infectar de tres maneras: durante la cirugía, en el período perioperatorio, o bien, si el paciente presenta algún tipo de bacteremia.²

Las IPA se clasifican en función del período de tiempo transcurrido, desde que se realiza el implante hasta que se presentan. Es decir:

a) Temprana: Son las que ocurren en los primeros tres meses después de la intervención.

b) Intermedia: Las que se presentan de 3-24 meses después de la artroplastia.

c) Tardía: Las que aparecen 24 meses después de la artroplastia.

Cuando se trata de infecciones tempranas, la causa más común suele ser una inoculación perioperatoria (manipulación antes, durante y después de la cirugía), mientras que las infecciones tardías se adquieren por vía hematológica (bacteremias).⁶

2.1.3 Microbiología de las IPA

La etiología es bien conocida, predominando las infecciones causadas por microorganismos Gram positivos², que constituyen al menos el 75% de los casos, especialmente aquellos originados por el género *Staphylococcus* (60%); de estos, el 25% se deben a *S. aureus* y el 35% a *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN)¹⁰. Evidentemente otros microorganismos tales como *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* y bacilos Gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, y *Klebsiella spp.*) también son aislados frecuentes a partir de las infecciones ortopédicas, principalmente en IPA crónicas.¹⁰

2.2 *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN)

El género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*. Actualmente están descritas 43 especies y 23 subespecies, tanto de origen humano como animal. La definición del grupo heterogéneo de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) se basa en procedimientos

diagnósticos que satisfacen la necesidad de diferenciar microbiológicamente a *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de aquellas categorizadas históricamente como no patógenas (SCN), aunque con el paso de los años se ha encontrado que en este último grupo se encuentran algunos de los principales patógenos nosocomiales (figura 1).¹¹

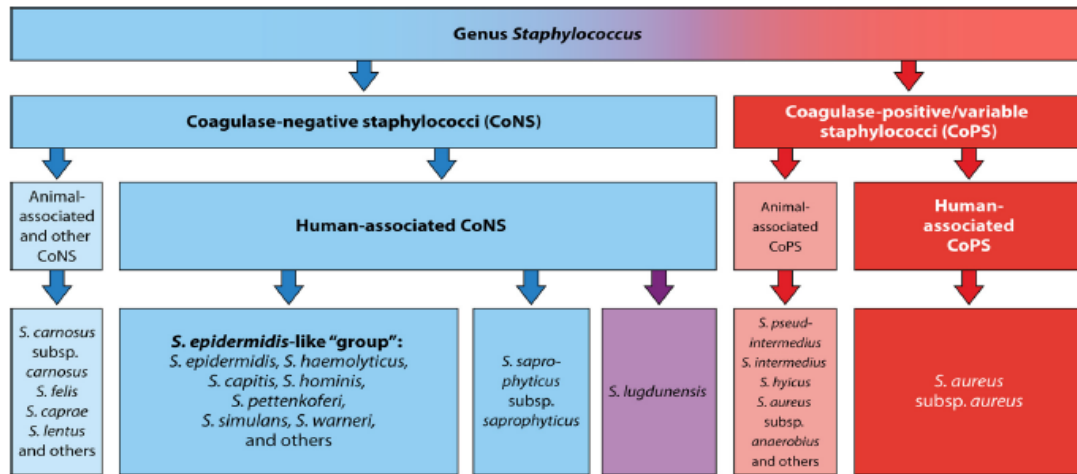


Figura 1. Clasificación del género *Staphylococcus*¹¹

En los seres humanos, *S. epidermidis* es el agente causal de IPA de mayor prevalencia, seguido por *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. lugdunensis*. Sin embargo, se sabe que inclusive especies menos virulentas de SCN pueden causar infecciones; bajo condiciones que las favorezcan, aun cuando su reservorio natural no sea el humano; algunos ejemplos se presentan en la tabla 2.^{5,7,11}

Tabla 2. *Staphylococcus* coagulasa negativos relacionados con infecciones en humanos⁷.

Especies frecuentemente asociadas con enfermedad	Subespecies	Hábitat natural
<i>S. epidermidis</i>		Humanos, mamíferos domésticos
<i>S. haemolyticus</i>		Humanos, primates
<i>S. lugdunensis</i>		Humanos
<i>S. saprophyticus</i>		Humanos, mamíferos
<i>S. capitis</i>	<i>capitis</i>	Humanos
<i>S. capitis</i>	<i>ureolyticus</i>	Humanos, primates
<i>S. caprae</i>		Humanos, caprinos
<i>S. carnosus</i>		Cárnicos, pesacados
<i>S. hominis</i>		Humanos
<i>S. lentus</i>		Humanos, mamíferos domésticos
<i>S. pasteurii</i>		Humanos, mamíferos
<i>S. petrasii</i>		Humanos
<i>S. pulvereri</i>		Humanos, pollo
<i>S. saccharolyticus</i>		Humanos
<i>S. schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Humanos
<i>S. schleiferi</i>	<i>coagulans</i>	Perros
<i>S. simulans</i>		Humanos mamíferos
<i>S. warneri</i>		Humanos, primates, mamíferos domésticos
<i>S. xylosum</i>		Humanos, mamíferos, aves.

2.2.1 Importancia clínica de los SCN

La importancia clínica de los SCN ha incrementado durante las últimas dos décadas, debido a que, aunque se sabe que su nicho microbiológico es la piel y mucosas, bajo ciertas circunstancias pueden convertirse en patógenos oportunistas.^{3,24} El interés en el estudio de las infecciones causadas por este grupo de microorganismos se ha relacionado con el aumento en los procedimientos quirúrgicos que implican la utilización de dispositivos médicos, como implantes protésicos, catéteres y dispositivos intravasculares, principalmente.¹²

La virulencia de los SCN está fundamentalmente relacionada con la capacidad de ciertas cepas para expresar adhesinas y formar biopelículas sobre los dispositivos protésicos y catéteres intravasculares, dentro de los cuales los microorganismos se agregan y forman macrocolonias. Estas crecen protegidas por una matriz extracelular que les permite evadir la acción de antimicrobianos, anticuerpos y otros mecanismos de defensa del hospedero.^{12,19} La producción de biopelículas, es considerada como un factor importante de virulencia en las cepas de SCN, ya que su difícil erradicación puede favorecer el desarrollo de infecciones crónicas.¹³

Además, los SCN pueden sintetizar enzimas tales como lipasas, ADNasas, termonucleasas, hemolisinas y exoenzimas que degradan los tejidos del huésped contribuyendo a la persistencia de la infección.¹²

2.2.2 Identificación, diagnóstico y tratamiento

Desde el punto de vista del diagnóstico microbiológico y clínico, el cultivo e identificación de las especies de SCN son complicados, porque bioquímicamente los *Staphylococcus sp* dan resultados similares, dificultando la identificación de la especie.²⁹ El método estándar para su propagación e identificación consiste en su cultivo en un medio enriquecido como lo es el agar sangre de carnero, ya que además de ofrecer condiciones óptimas de crecimiento, permite diferenciar características macroscópicas entre los SCN (colonias pequeñas, blanquecinas y puntiformes) y *S. aureus* (colonias más grandes, blanquecinas o con pigmento amarillo según el tiempo de crecimiento y presentan hemólisis).³⁰

En el caso de las muestras clínicas provenientes de componentes protésicos, el valor diagnóstico aumenta, si antes de ser cultivadas son sometidas a un proceso de sonicación, que consiste en desprender las células adheridas al dispositivo mediante la aplicación de ondas de ultrasonido de baja frecuencia (40kHz/s)^{13,14}.

Para identificar al nivel de especie, se han implementado sistemas comerciales que permiten discernir entre microorganismos con base en su actividad metabólica. Tal es el caso del sistema VITEK 2 de Biomérieux, el cual utiliza tarjetas de identificación que contienen 64 pozos con diferentes sustratos diseñados por el fabricante y reactivos colorimétricos. Estas tarjetas son inoculadas con una suspensión de un cultivo microbiano puro y el perfil metabólico es interpretado de forma automática, con resultados confiables. Aunado a la identificación, este sistema también ofrece tarjetas

de sensibilidad a antibióticos, por lo que favorece la obtención de un perfil completo de identificación y susceptibilidad para cada cepa analizada.¹⁵

El problema más difícil en el diagnóstico de los SCN es la evaluación de su relevancia clínica, debido a que al tener su nicho ecológico en piel y mucosas pueden presentarse tres situaciones; i) contaminación de la muestra durante la toma y procesamiento de la misma; ii) colonización fisiológica; iii) una infección clínicamente significativa.^{4,5}

Para determinar si una infección es clínicamente significativa se deben considerar diferentes factores, además de los resultados microbiológicos; por ejemplo las manifestaciones clínicas (fiebre y dolor, principalmente), los resultados de sangre periférica y líquido sinovial, la evaluación histológica del tejido periprotésico y, en algunos casos, resultados radiográficos.^{16,17}

2.2.3 Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los SCN.

Se ha encontrado que todas las especies del grupo de los SCN, tanto de origen humano como animal, son un importante reservorio de elementos genéticos móviles que conducen a desarrollar resistencia a antibióticos beta lactámicos, así como a otras clases de antimicrobianos, lo que conlleva a una gran dificultad para diseñar una estrategia terapéutica general.¹⁸

En el caso de cepas que presentan resistencia a beta lactámicos como las penicilinas sintéticas (por ejemplo, Oxacilina), se recomienda el uso de glucopéptidos como la

vancomicina y la teicoplanina, o de oxazolidinonas como el linezolid, aunque cada vez se encuentran con mayor frecuencia casos de multiresistencia.^{13, 14,15}

2.3 Formación de biopelículas en *Staphylococcus coagulasa* negativos.

La patogenicidad de este grupo de microorganismos se refleja en que causan infecciones crónicas y persistentes, asociadas principalmente con la capacidad que tienen de adherirse a estructuras vivas (ejemplo: heridas) e inertes (ejemplo: dispositivos médicos) colonizándolas mediante la formación de biopelículas, probablemente su mayor factor de virulencia.^{11,12}

Las biopelículas representan comunidades microbianas que crecen agregadas y rodeadas por una matriz extracelular o glicocálix, la cual ellos mismos producen (efecto *slime*), y les permite adherirse covalentemente a diversas superficies. La matriz extracelular está compuesta por exopolisacáridos (50-90% de carbono orgánico total), fimbria amiloide y adhesiva, proteínas de superficie no fimbriales y ADN extracelular (eDNA).^{19,22,23}

En el caso de *Staphylococcus spp*, los exopolisacáridos que conforman su matriz extracelular están compuestos por poli-N-acetilglucosamina (PNAG).²⁶ Esta estructura propicia la formación de numerosos puentes de hidrógeno que dan lugar a una estructura altamente hidratada y muy resistente a la tracción, lo que permite a las células bacterianas tener una interacción muy cercana e intercambiar material genético fácilmente.²² La naturaleza resiliente de las biopelículas también se atribuye a la formación de comunidades altamente organizadas, gracias a la expresión de

autoinductores que generan señales químicas dentro de la biomasa (*quorum sensing*; QS); ello da lugar a la "división del trabajo" de la población, con subpoblaciones de bacterias que muestran una expresión génica diferencial, en respuesta a la disponibilidad local de nutrientes y oxígeno.^{10,22}

Aunque las diferencias en la formación de biopelículas pueden existir incluso dentro de una única cepa cultivada bajo diferentes condiciones ambientales, la estructura y composición de la matriz extracelular siguen principios comunes.²⁶

2.3.1 Biosíntesis de las biopelículas

El proceso de biosíntesis de las biopelículas es muy complejo y se encuentra regulado por las condiciones del medio de crecimiento y en especial por la disponibilidad de nutrientes y las características estructurales de las biopelículas.²⁸

Aún se desconoce el mecanismo exacto necesario para formar una biopelícula estafilocócica funcional y madura; sin embargo, se han estudiado y caracterizado cuatro pasos esenciales en el proceso; (i) Fijación de las bacterias a una superficie; (ii) Acumulación bacteriana; (iii) Maduración de la biopelícula y (iv) Disgregación de la matriz extracelular (Figura 2).^{24,25,27}

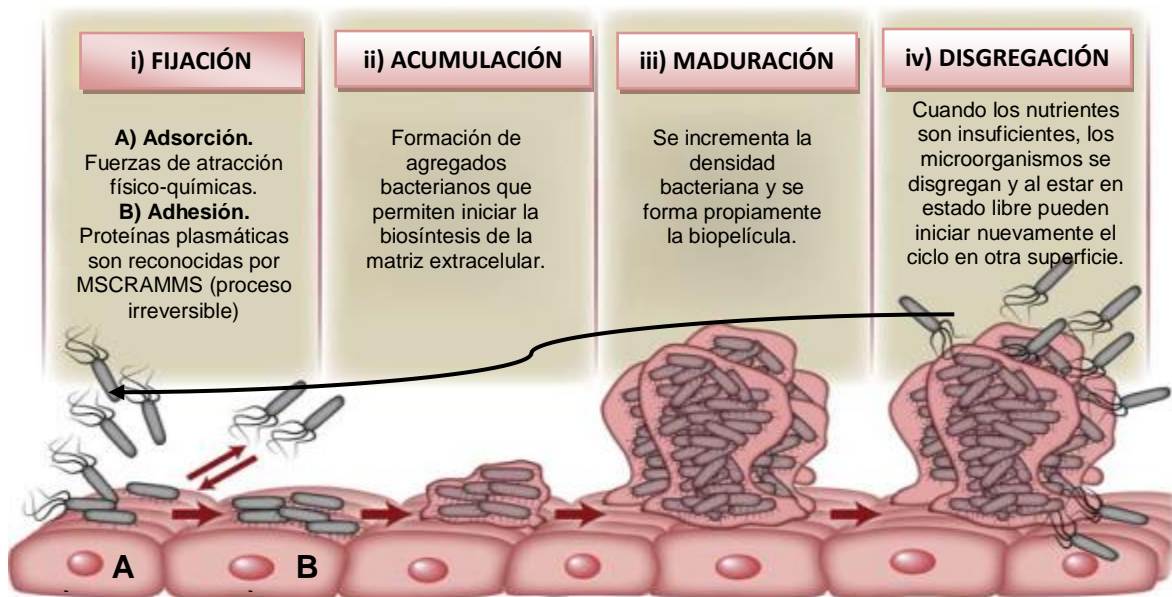


Figura 2. Representación esquemática de las fases para la formación de biopelículas²⁰. MSCRAMMS, por sus siglas en inglés: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules.

Fase de fijación. El paso inicial en la formación de biopelículas es la **adsorción** de las bacterias a una superficie mediante interacciones inespecíficas y de naturaleza hidrófoba; generalmente se trata de fuerzas electrostáticas débiles que permiten que este paso sea reversible.²³ En el caso de las IPA, cuando los dispositivos médicos son implantados, inmediatamente se recubren con proteínas plasmáticas, las cuales pueden ser reconocidas por componentes de la pared bacteriana, formando uniones covalentes; Fase de **adhesión**. Los componentes en que se basa esta etapa se conocen como «componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas de matriz adhesiva» (MSCRAMMs, por sus siglas en inglés: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules).³¹ En el caso de *S. epidermidis* posee decenas de MSCRAMMs que interactúan con proteínas de matriz extracelular,

pero las más importantes son SdrG/Fbe, Embp, AtlE, Aap y GehD, que se unen a fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y colágena, respectivamente.³²

Fase de acumulación. Una vez que las bacterias logran adherirse, comienzan a dividirse y a formar pequeños agregados, generando una mayor cercanía entre las mismas. De esta manera, se forma una pequeña comunidad de bacterias que comienzan a generar señales químicas, en respuesta a metabolitos secundarios, ya que funcionan como activadores de un mecanismo de señalización química que utilizan las bacterias para comunicarse entre sí, conocido como QS.³³ Cuando la concentración local de señales químicas producidas por el QS alcanza un nivel umbral, sugiere que la población microbiana ha alcanzado una densidad mínima, lo que desencadena el inicio de cambios fenotípicos importantes.³⁴

El principal cambio fenotípico en esta etapa (acumulación) es el inicio de la biosíntesis de la matriz extracelular en la que las células crecerán embebidas. Durante este paso el QS induce la expresión de genes que codifican para los componentes de la matriz extracelular.³³ En este sentido se ha encontrado que la mayoría de las cepas formadoras de biopelículas en *S. epidermidis*, expresan principalmente los genes del operón *icaADBC*, que codifica para el polisacárido de adhesión intracelular (PIA), principal componente de dicha matriz. También se han encontrado cepas de *S. epidermidis* que producen biopelículas gracias a la expresión de genes diferentes a los que codifican para PIA, denominados PIA-independientes, y el cual es dirigido por expresión de genes que codifican para adhesinas involucradas en esta fase del ciclo, tales como como son: *aap* (proteína asociada a acumulación), *bhp* (proteína asociada a

biopelículas) y *embp* (proteína de unión a matriz extracelular). Además de estas moléculas, durante la fase de acumulación también se sintetizan otros componentes de la matriz, como ácidos teicoicos y DNA extracelular, que tienen la capacidad de interactuar con PIA.²⁶

Fase de maduración. Cuando la señalización celular crece lo suficiente, el microorganismo responde en masa y se comporta como grupo²³. En esta etapa se ha formado propiamente la biopelícula; es decir, la síntesis de todos los componentes de la matriz extracelular permite que la población bacteriana adquiera una conformación tridimensional en forma de “hongo”, gracias a la que ahora tiene la capacidad para llevar a cabo su metabolismo e incrementar la densidad poblacional. La matriz extracelular provee a las bacterias las condiciones óptimas para la asimilación de nutrientes, a través de canales de agua que favorecen la microcirculación; así mismo, la nueva estructura les confiere resistencia a condiciones desfavorables.³⁷

Fase de disgregación.

Cuando el sustrato es insuficiente o se ha generado un exceso de productos de degradación del metabolismo bacteriano, los microorganismos pueden dispersarse en forma aislada o en conglomerados y colonizar nuevas superficies para iniciar un nuevo ciclo.³⁸ La dispersión de los microorganismos depende de la degradación de la matriz extracelular, la cual es consecuencia de la expresión de genes que codifican para DNAsas, hidrolasas y moléculas con propiedades tensoactivas que desestabilizan la matriz.³⁹ Un ejemplo de moléculas con propiedades tensoactivas son las modulinas

solubles en fenol (PSM), una clase de péptidos descritos previamente como agentes proinflamatorios en *S. epidermidis*.²³

La síntesis de estas proteínas se encuentra regulada por el gen accesorio regulador (*agr*), cuya activación causa un aumento en la producción de las mismas.⁴⁰

2.3.2 Mecanismos moleculares para la formación de biopelículas en SCN

Para el establecimiento de una biopelícula madura y funcional, es necesaria la síntesis de una gran variedad de moléculas de adhesión, incluyendo al polisacárido de adhesión intracelular (PIA), a factores proteínicos como una proteína homóloga a Bap en *S. aureus* (Bhp en *S. epidermidis*), la proteína asociada a acumulación (Aap) y la proteína de unión a matriz extracelular (Embp); además, se requiere de ácidos teicoicos y DNA extracelular.⁴¹

2.3.2.1 Operón *icaADCB*

El principal elemento para la formación de biopelículas es el polisacárido de adhesión intracelular (PIA), el cual está conformado por residuos de poli-N-acetil-glucosamina, y cuya biosíntesis se asocia a la expresión del operón *icaADCB*, éste constituido por un gen regulador (*icaR*) y cuatro genes efectores (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*). Su expresión está directamente relacionada con las fases de fijación y acumulación bacteriana.^{23,41}

El PIA se forma a partir de poli-N-acetilglucosamina (PNAG) por la enzima N-acetilglucosamina transferasa; codificada por el *locus* de adhesión intercelular (*ica*), y particularmente por el gen *icaA*. La expresión de *icaA* por sí misma solo induce a una

baja actividad enzimática, pero la coexpresión de *icaA* e *icaD* conduce a un aumento significativo en la actividad de la N-acetilglucosamina transferasa, que cataliza la formación de oligómeros con aproximadamente 20 residuos. La expresión del gen *icaC* sirve para transportar a los oligómeros de PNAG al exterior de la célula, en donde son desacetilados por la proteína codificada por *icaB* (**Figura 3**).^{42,43}

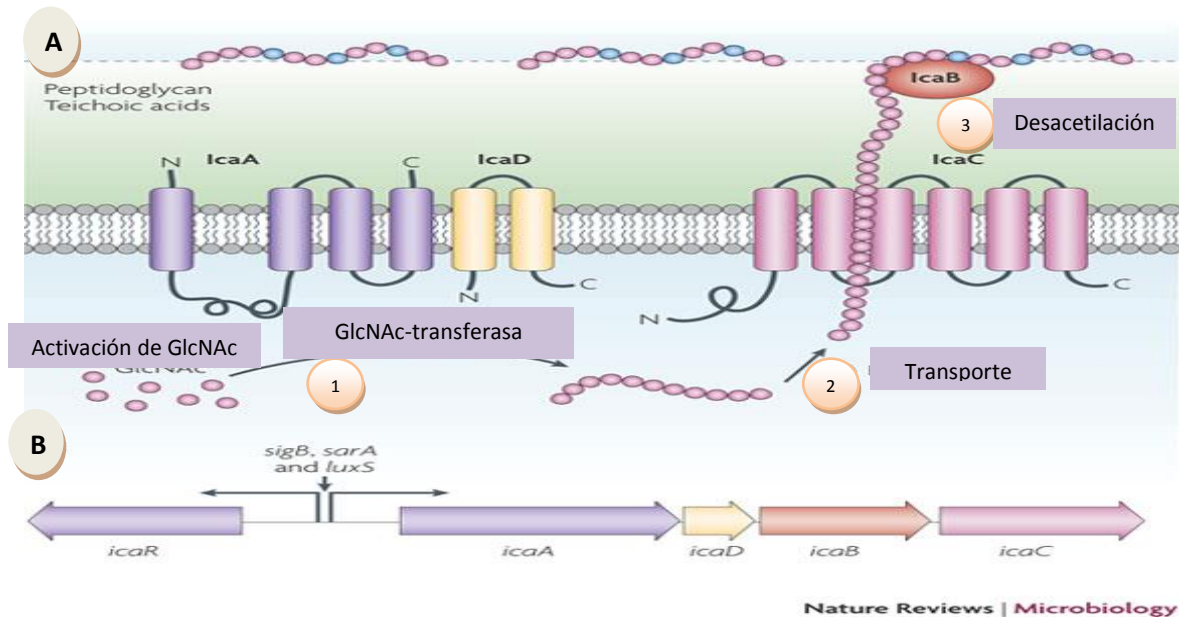


Figura 3. Representación esquemática de la biosíntesis de PIA.²³

GlcNAc: β -1,6-N-acetilglucosamina

A) 1) La síntesis del exopolisacárido poli-N-acetilglucosamina (PNAG) se inicia con la activación de la β -1,6-N-acetilglucosamina (GlcNAc) gracias a la GlcNAc transferasa que está codificada por *icaA*; esta enzima necesita una proteína de membrana accesoria (*IcaD*) para llevar a cabo su actividad. 2) La cadena de PNAG creciente es exportada por la proteína de membrana *IcaC*. 3) Después de la exportación, la desacetilasa *IcaB*, situada en la superficie celular, elimina algunos de los grupos N-acetilo, dando al polímero un carácter catiónico que es esencial para la fijación de la superficie). **B)** Las proteínas *Ica* están codificadas por el locus del gen *ica* que contiene el operón *icaADBC* y el gen *icaR*, que codifica para una proteína reguladora. La

expresión del operón *icaADBC* está regulada directamente por el promotor *icaA* o mediante la expresión de *icaR*, ambos controlados por una serie de proteínas reguladoras globales (SigB, SarA y LuxS). *El sombreado verde representa la carga negativa y el sombreado azul representa la carga positiva. C, carboxilo; N, amino.

Aunque el PIA es un factor altamente significativo para la formación y maduración de biopelículas, se han encontrado cepas de *S. epidermidis* clínicamente relevantes que no codifican para el operón *icaADBC* y que, por lo tanto, no sintetizan PIA. En estas cepas, la fase de acumulación bacteriana está dirigida por una vía alterna denominada *ica*-independiente, en la cual participan tres genes que codifican para las siguientes proteínas: Aap, Bhp y Embp.⁴⁴

Tabla 3. Proteínas involucradas en la vía alternativa para la formación de biopelículas.

Gen	Proteína que codifica	Fase de formación de la biopelícula involucrada
<i>Bap/bhp</i>	Proteína asociada a biopelícula (<i>S. aureus</i>) / Proteína homóloga (<i>S. epidermidis</i>)	Fase de fijación. Es una proteína de adhesión superficial
<i>Embp</i>	Proteína de unión a la matriz extracelular	Fase de acumulación
<i>Aap</i>	Proteína asociada a acumulación	Fase de acumulación

2.3.2.2 Proteína Aap

Aap es una proteína de 220 kDa que es esencial para las fases de acumulación y fijación en *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984), encontrándosele en aproximadamente el 90% de los aislados clínicos de esta especie.⁴⁵

Está organizada por un péptido señal en el extremo amino, seguido por un dominio A que contiene un número de repeticiones variables de 16 aminoácidos y que está implicado en la colonización de la piel y en la adherencia a células epiteliales descamadas. Además, está compuesta por una región B comprendida por entre 3 y 14 dominios que contienen 128 aminoácidos (Figura 4).⁴⁶

Se ha encontrado que la eliminación del dominio Aap A por una proteasa bacteriana o del hospedero promueve la acumulación celular y la formación de la biopelícula, en tanto que la región B expuesta favorece la adhesión célula-célula a través de un mecanismo dependiente de Zn^{2+} que implica la formación de estructuras trenzadas similares a las uniones de la región Aap B.⁴⁷



Figura 4. Esquema de la organización estructural de la proteína Aap.

S: Péptido señal, W: Pared celular, M: Membrana celular, Dominio A, Región B: En la que destaca un número repetido de dominios G5 y E, los cuales difieren entre cepas.⁴⁷

2.3.2.3 Proteína Bhp

El gen *bhp* es un homólogo del gen *bap* en *S. aureus* y codifica para la proteína Bhp en *S. epidermidis*, la cual corresponde a una molécula de superficie que tiene un peso de 284.4 kDa; se ha demostrado que en ausencia del PIA, la Bhp induce la formación de la biopelícula, promoviendo tanto la fijación primaria a superficies, como la adhesión intercelular.^{48,49} En contraste con la Aap, Bhp se ha encontrado en 15 a 45% de los aislamientos de *S. epidermidis*.⁴⁵

2.3.2.4 Proteína Embp

Es una proteína de 1 MDa cuya función en la formación de biopelículas resulta suficiente en ausencia del PIA o Aap, debido a que combina propiedades de unión a la matriz extracelular y promueve la adhesión intercelular.⁵⁰

2.4 Resistencia a oxacilina en SCN

La resistencia a este antibiótico es mediada por el gen *mecA*, el cual codifica para una proteína de unión a una penicilina de baja afinidad a la que se denomina PBA-2. La presencia de este gen se encuentra altamente relacionada con aislados de origen nosocomial y se transfiere a través de un elemento genético móvil que contiene una gran cantidad de polimorfismos, conocido como cassette estafilocócico cromosomal (SCCmec).⁵¹

2.4.1 Cassette estafilocócico cromosomal (SCCmec)

La resistencia a metilina en *Staphylococcus spp* está mediada por el gen *mecA*, el cual forma parte del cassette estafilocócico cromosomal (SCCmec). Este último corresponde a un elemento genético móvil compuesto por tres elementos principales⁵²:

- Complejo gen ***mec***; éste está comprendido por el gen *mecA*, por genes reguladores, *mecI* (represor) y *mecR1* (inductor), así como por una secuencia de inserción.^{23,53}
- Complejo de genes ***ccr***, es el responsable de la inserción y escisión del cassette en el genoma bacteriano.²³ Está compuesto por los genes *ccr* y por los marcos abiertos de lectura (ORF) circundantes, varios de los cuales tienen funciones

desconocidas. Actualmente se han identificado tres genes *ccr*, filogenéticamente distintos: *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*, cuya clasificación y nomenclatura se basa en la similitud de sus secuencias de DNA; si los diferentes haplotipos tienen una similitud $\leq 50\%$ y se consideran distintos si el parentesco es mayor del 85% se agrupan en el mismo haplotipo. En el caso de los genes *ccrA* y *ccrB* se han encontrado cuatro haplotipos diferentes (con base en este criterio), en tanto que para el gen *ccrC* sólo se reconoce uno (similitud $\geq 87\%$).⁵⁴ En la **figura 4** se ilustran las relaciones filogenéticas y las similitudes de la secuencia de DNA de los genes *ccr* más representativos para algunas especies de SCN; además se incluyen las cepas de referencia en las que se han estudiado.^{53,54}

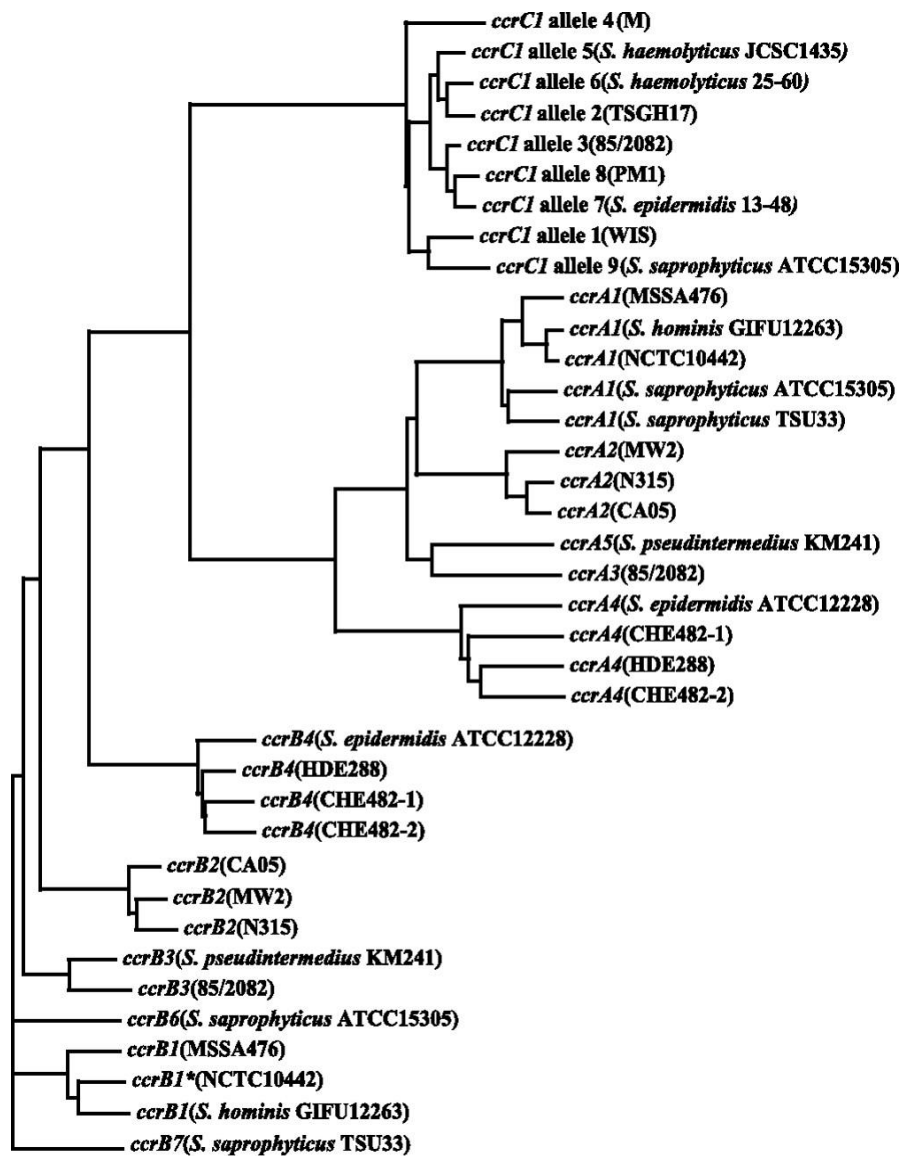


Figura 4. Relación filogenética de los diferentes haplotipos de los genes *ccr* y las especies en las que se han estudiado.⁵⁴

La razón por la cual este complejo determina la integración o eliminación del cassette del genoma bacteriano, tiene que ver con el hecho de que este grupo de genes codifican para recombinasas e integrasas sitio- específicas.⁵³

- **J**; Regiones de unión (*junkyard*); contienen diversos genes que codifican para incrementar la resistencia bacteriana o para algunos factores de virulencia, así como algunos pseudogenes, es decir, componentes no esenciales para el cassette.⁵⁴

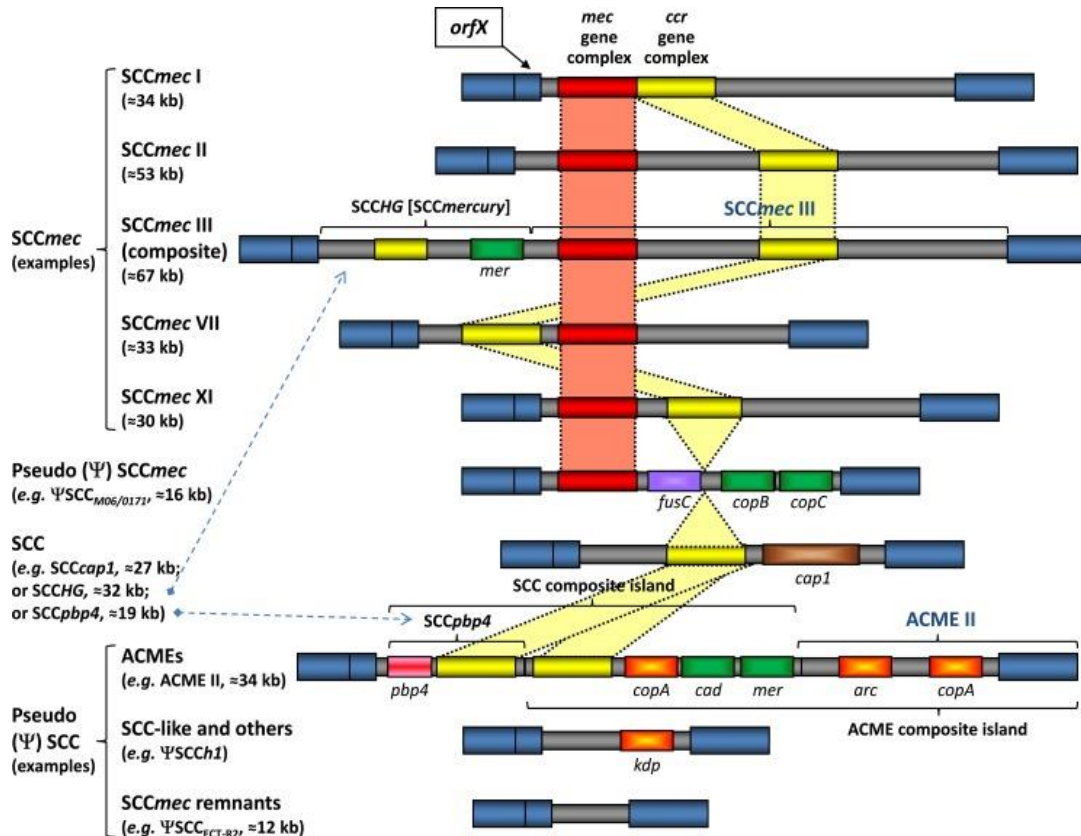


Figura 6. Representación esquemática de los SCCmec¹¹

Representación de los elementos principales en algunos tipos de SCCmec; en donde las bandas color rojo corresponden al complejo *mec*, las amarillas al complejo *ccr* y las grises a las regiones de unión (J). Además se señalan algunos genes que codifican para resistencia a otros agentes antimicrobianos; en color violeta el gen *fusC* (resistencia a ácido fusídico), en color verde los genes que confieren resistencia al efecto tóxico de algunos metales como cobre (*copB* Y *copC*), cadmio (*cad*), mercurio (*mer*); en color naranja la resistencia a arsénico (*arc*). También genes que codifican

para factores de virulencia; en color café se señala el gen *cap1* que codifica para un polisacárido de la cápsula; y en rosa otro subtipo de proteína de unión a penicilina (PBP4)

A la fecha se han reportado 11 tipos y varios subtipos de SCCmec (I-XI). En SCN, los subtipos más frecuentes son el III, IV y V, ya sea solos o en diversas combinaciones. Los SCCmec mejor caracterizados hasta el momento son del I al V; algunas de sus principales características se presentan en la tabla 4.⁵⁴

Tabla 4. Tipos de SCCmec y sus características

Tipo	Tamaño (pb)	Características principales	Referencia
I	34,364	Sólo contiene transposones o plásmidos que confieren resistencia a meticilina y a metales pesados	54
II	53, 017	En adición con los genes que confieren resistencia a meticilina (<i>mecA</i> y <i>mecR</i>), contiene al transposón Tn554 que es responsable de la resistencia a eritromicina y estreptomicina	54
III	66, 896	En adición con los genes que confieren resistencia a meticilina (<i>mecA</i> y <i>mecR</i>), contiene los transposones Tn554, ψ Tn554 (resistencia a cadmio) y el plásmido pT181 (resistencia a tetraciclinas y mercurio)	54
IV	67,354	Es el más frecuentemente relacionado con las infecciones adquiridas. Es un elemento pequeño que sólo lleva genes de resistencia relacionados con <i>mecA</i> Existen cuatro subtipos (IVA, IVB, IVC y IVD), los cuales sólo difieren en la región “río arriba” del complejo <i>ccr</i>	54
V	27.624	Sólo lleva genes que codifican para la resistencia a oxacilina	54

3. Planteamiento del problema

El grupo de los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) ha emergido como uno de los principales agentes etiológicos asociados a las infecciones de prótesis articulares (IPA), las cuales generan altas tasas de morbilidad y mortalidad, además de altos costos económicos a los sistemas de salud y a los mismos pacientes que las padecen.

Hasta ahora, la virulencia de SCN se asocia principalmente a altos índices de resistencia antimicrobiana y a su capacidad para formar biopelículas; sin embargo, aún no resulta muy claro que estos microorganismos no contengan otros genes de patogenicidad.

4. Justificación

Se ha observado que en aislados clínicos de SCN asociados a infecciones de prótesis articulares se presentan diferentes respuestas a las alternativas terapéuticas empleadas; ello se debe a que existe una gran diversidad genotípica y fenotípica en cada clona, aun cuando pertenezcan a la misma especie. Por esta razón, en el presente trabajo se busca establecer fenotípica y molecularmente, los mecanismos de virulencia en una colección de SCN aislados a partir de pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados de infecciones en prótesis articulares.

5.2 Objetivos particulares

1. Identificar y determinar el perfil de susceptibilidad de los SCN aislados a partir de IPA, mediante un sistema automatizado (Vitek 2).
2. Cuantificar *in vitro* la producción de biopelículas en los SCN.
3. Detectar por PCR punto final al gen *mecA* y a los genes asociados a biopelículas: *icaADBC*, *aap*, *bhp* y *embp*.
4. Tipificar molecularmente el Cassette Estafilocócico Cromosomal (SCCmec).

6. Metodología

6.1 Tipo de estudio

Estudio transversal y descriptivo.

6.2 Selección de cepas

De una colección de *Staphylococcus* aislados de Infecciones asociadas a prótesis articulares, se seleccionaron aquellos *Staphylococcus coagulasa* negativos identificados entre 2011 y 2015 en el Laboratorio de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación.

6.3 Identificación y pruebas de sensibilidad

Los aislados se identificaron mediante el sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux, Francia), empleándose las tarjetas GP; de la misma forma se obtuvo su perfil de susceptibilidad, utilizando tarjetas AST-GP67, las cuales fueron procesadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los antibióticos probados se muestran en la tabla

1.

Tabla 1. Antibiograma para *Staphylococcus sp.*

Antibiótico	Abreviatura
Penicilina	PE
Oxacilina	OXA
Gentamicina	GN
Ciprofloxacino	CIP
Levofloxacino	LVX
Moxifloxacino	MXF
Eritromicina	E
Clindamicina	CC
Synercid (estreptograminas A y B)	SYN
Linezolid	LZD
Vancomicina	VN
Tetraciclina	TE
Rifampicina	RF
Trimetoprim/sulfametoxazol	SXT

6.4 Caracterización fenotípica

6.4.1 Producción de biopelículas *in vitro*

La producción de biopelículas se realizó mediante un ensayo semicuantitativo *in vitro* con cristal violeta, descrito por Christensen y col⁸⁰. Brevemente, crecimos los aislados durante 18 h en caldo tripticase soya suplementado con 2% de glucosa (TSB-G); posteriormente el cultivo se diluyó y se llevó a una concentración de 1×10^8 células/mL (0.5 en la escala de McFarland). De esta solución se depositaron 20 μ L en una microplaca de poliestireno fondo plano de 96 pocillos, las cuales contenían 180 μ L de medio TSB-G al 2% (las cepas se inocularon por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C/24 h; a continuación se decantó el medio de cultivo y se efectuaron 3 lavados para cada pocillo, con 200 μ L de solución salina al 0,85%(p/v), a fin de eliminar aquellas bacterias que crecieron en forma libre; se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente, se agregaron 150 μ L de la solución de cristal violeta 0,2% (p/v), que se dejó actuar durante 15 minutos; se decantó el colorante y nuevamente se realizaron lavados con solución salina para eliminar el exceso; se secaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se extrajo el colorante con 150 μ L de alcohol etílico, finalmente se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro para placas ELISA (xMark, Bio-Rad) a una $\lambda=492$ nm, incluyéndose a los aislados clínicos y a las cepas de referencia ATCC 12228 (control negativo) y ATCC 35984 (control positivo).

El procedimiento se realizó por duplicado en experimentos independientes.

6.4.2 Tratamiento de resultados para caracterización de biopelículas

Para cada cepa se calculó el promedio de la densidad óptica obtenida en las seis réplicas y se determinó su desviación estándar para asegurar la concordancia entre los resultados obtenidos. La categorización del tipo de biopelícula se llevó a cabo con base en la densidad óptica de la cepa que se usó como control negativo (ATCC 12228), así como con los criterios de Stepanovic y col⁸¹ (ver **Tabla 2**).

Tabla 2. Criterios para caracterizar productores de biopelícula.

Criterio	Tipo de biopelícula	Abreviatura
$DO < 2(DO_{\text{control negativo}})$	No productor	NP
$2(DO_{\text{control negativo}}) \leq DO \leq 4(DO_{\text{control negativo}})$	Productor débil	PD
$DO > 4(DO_{\text{control negativo}})$	Productor fuerte	PF

6.5 Caracterización genotípica

6.5.1 Extracción de material genético

Para la extracción de DNA de las 66 cepas se preparó una solución de CHELEX-100 al 10% (Bio-Rad); ésta es una resina de intercambio catiónico que permite separar los contaminantes del material genético (principalmente los metales catiónicos) para poder llevar a cabo la reacción de polimerización. Se colocaron 200 μ L de esta solución en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se añadió una alícuota correspondiente a 1×10^8 células de cada cepa de SCN; la mezcla se homogeneizó con ayuda de un vórtex y se colocó durante una hora a 95°C en el equipo Heating Block Fisher Scientific™. Transcurrido el

calentamiento, las mezclas se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se retiró con mucho cuidado, evitando tocar el pellet; éste se conservó y almacenó en congelación (-20°C) para su posterior utilización.

6.5.2 Amplificación de genes

La detección de genes fue llevada a cabo mediante PCR punto final, empleándose iniciadores cuya secuencia fue previamente descrita (ver **Tabla 4**). La mezcla de reacción contenía Buffer 10X (AppliedBiosystems), MgCl₂ (AppliedBiosystems), desoxinucleotidotrifosfato (Invitrogen), Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, AppliedBiosystems), oligonucleótidos (Sigma Aldrich), DNA y agua grado molecular libre de DNAsas y RNAsas hasta completar un volumen de 50 µL por reacción. Las condiciones de reacción para cada gen amplificado se presentan en la **Tabla 3**.

Para la amplificación se utilizó el termociclador Veriti (AppliedBiosystems) con las condiciones descritas en la **Tabla 3**. Se utilizaron 10 µl de cada una de las reacciones; para detectar los productos de PCR y se corrieron en un gel de agarosa grado molecular al 1.5% (Invitrogen) durante una hora. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb (Invitrogen).

Tabla 3. Condiciones de reacción para amplificación de genes.

Gen	Condiciones de reacción							Condiciones del ciclo	Control positivo	Referencia
	Buf fer 10X (µL)	MgCl ₂ (mM)	dNTPs (mM)	Oligonucleótidos (pmol)	Taq polimerasa (U)	DNA (ng)	Volumen de reacción (µL)			
<i>mecA</i>	5	3	4	25	2.5	20	50	1 ciclo 94°C/3 min 30 ciclos 94°C/30 s 30 ciclos 55°C/3 s 30 ciclos 72°C/45 s 1 ciclo 72°C/10 min	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	82
<i>icaA</i>	5	2	6	10	0.5	20	50	1 ciclo 94°C/5 min 40 ciclos 94°C/30 s 40 ciclos 55°C/3 s 40 ciclos 72°C/1 min 1 ciclo 72°C/7 min	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	83
<i>icaD</i>										
<i>icaB</i>										
<i>icaC</i>										
<i>aap</i>	5	1.5	6	10	1.5	20	50	1 ciclo 95°C/7 min 35 ciclos 94°C/1 min 35 ciclos 57°C/1 min 35 ciclos 72°C/1 min 1 ciclo 72°C/7 min	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	84
<i>bhp</i>										
<i>embp</i>										

SCCmec	5	1.5	6	10	1.5	20	50	1 ciclo 95°C/5 min 10 ciclos 95°C/45 s 10 ciclos 65°C/45 s 10 ciclos 72°C/1 min 25 ciclos 95°C/45 s 25 ciclos 55°C/45 s	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	85
--------	---	-----	---	----	-----	----	----	--	--	----

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de genes utilizados en el estudio.

Gen		Oligonucleótidos		Tamaño de amplicón	Referencia	
Resistencia a oxacilina	<i>mecA</i>	5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'	Adelante	533pb	82	
		5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'	Atrás			
Operón <i>ica</i>	<i>icaA</i>	5'-ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA-3'	Adelante	103pb	83	
		5'-GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC-3'	Atrás			
	<i>icaD</i>	5'-ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG-3'	Adelante	198pb	83	
		5'-CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA-3'	Atrás			
	<i>icaB</i>	5'-CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA-3'	Adelante	302pb	83	
		5'-AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT-3'	Atrás			
<i>icaC</i>	5'-TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT T-3'	Adelante	400pb	83		
	5'-TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG-3'	Atrás				
Vía <i>ica</i> -independiente	<i>aap</i>	5'-AAA CGG TGG TAT CTT ACG TGA A-3'	Adelante	510pb	84	
		5'-CAA TGT TGC ACC ATC TAA ATC AGC T-3'	Atrás			
	<i>bap</i>	5'-ATG GTA TTA GCA AGC TCT CAG CTG G-3'	Adelante	1020pb	84	
		5'-AGG GTT TCC ATC TGG ATC CG-3'	Atrás			
	<i>embp</i>	5'-AGC GGT ACA AAT GTC AAT-3'	Adelante	500pb	84	
		5'-AGA AGT GCT CTAG CAT CAT CC-3'	Atrás			
	<i>SCCmec IVa</i>	5'-GCCTTATTCGAAGAAACCG-3'	Adelante	776pb	85	
		5'-CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG-3'	Atrás			
	<i>SCCmec IVb</i>	5'-TCTGGAATTACTTCAGCTGC-3'	Adelante	493pb	85	
		5'-AAACAATATTGCTCTCCCTC-3'	Atrás			
	Tipificación de <i>SCCmec</i>	<i>SCCmecIVc</i>	5'-ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC-3'	Adelante	200pb	85
			5'-TTGGTATGAGGTATTGCTGG-3'	Adelante		
<i>SCCmec IVd</i>	5'-CTCAAAATACGGACCCCAATACA-3'	Adelante	881pb	85		
	5'-TGCTCCAGTAATTGCTAAAG-3'	Atrás				
<i>SCCmec V</i>	5'-GAACATTGTTACTTAAATGAGCG-3'	Adelante	325pb	85		
	5'-TGAAAGTTGTACCCTTGACACC.3'	Atrás				

7. Resultados

7.1 Características de las muestras incluidas en el estudio.

En total se estudiaron 66 cepas, cuya distribución de especies y el tipo de infección de la cual se aislaron se presentan en la tabla 4. La especie aislada con mayor frecuencia fue *S. epidermidis*, y esta se encontró principalmente en infecciones de cadera.

Tabla 4. Características de aislamiento de las muestras clínicas incluidas en el estudio.

Microorganismo	n (%)	Tipo de muestra	
		Cadera	Rodilla
SCN	66 (100)	53 (80)	13 (20)
<i>S. epidermidis</i>	55 (83)	45 (82)	10 (18)
<i>S. hominis</i>	5 (8)	4 (80)	1 (20)
<i>S. lugdunensis</i>	1 (1.5)	0	1 (100)
<i>S. sciuri</i>	1 (1.5)	1 (100)	0
<i>S. capitis</i>	1 (1.5)	1 (100)	0
<i>S. caprae</i>	1 (1.5)	1 (100)	0
<i>S. haemolyticus</i>	1 (1.5)	0	1 (100)
<i>S. lentus</i>	1 (1.5)	1 (100)	0

7.2 Perfil de resistencia a antibióticos.

Las pruebas de sensibilidad mostraron que *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* y *S. lentus* fueron las especies con mayor resistencia a antibióticos, principalmente a penicilinas (PE, OXA) y quinolonas (CIP, LVX, MXF). Así mismo se encontró un bajo patrón de resistencia a macrólidos (E, CC) y glucopéptidos (GN, TE) y en el caso de la vancomicina y linezolid no se encontró ninguna cepa resistente (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil de resistencia con respecto a cada especie.

Especie	Perfil de resistencia													
	PE	OXA	GN	CIP	LVX	MXF	E	CC	SYN	LZD	VN	TE	RF	SXT
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>S. epidermidis</i>	44 (80)	43 (78)	10 (18)	30 (55)	32 (58)	33 (75)	19 (34)	12 (27)	2 (5)	0	0	10 (23)	6 (14)	22 (50)
<i>S. hominis</i>	5 (100)	4 (80)	3 (60)	4 (80)	3 (60)	3 (60)	4 (80)	2 (40)	0	0	0	0	0	3 (60)
<i>S. lugdunensis</i>	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i>	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. caprae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. lentus</i>	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	0	1 (100)
TOTAL	53	51	16	37	38	39	26	16	2	0	0	10	6	26

7.3 Caracterización fenotípica de biopelícula.

La prueba de adherencia con cristal violeta permitió determinar secuantitativamente la producción y el tipo de biopelícula presente en cada cepa, debido a que la intensidad de color se asocia directamente con la densidad de bacterias adheridas a la microplaca como se puede observar en la figura 2.

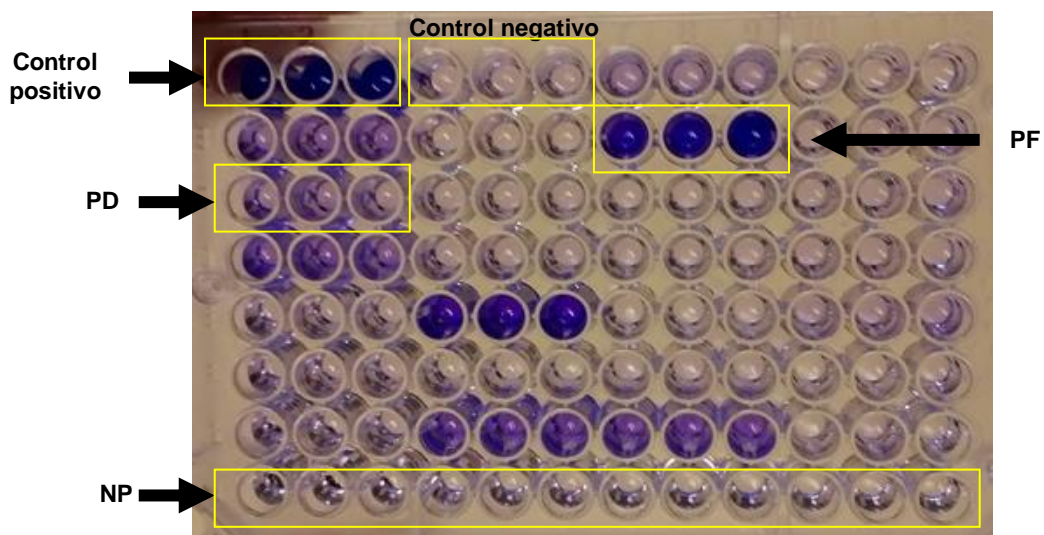


Figura 2. Prueba cuantitativa de adherencia con cristal violeta. Control positivo (*S. epidermidis* ATCC 35984), control negativo (*S. epidermidis* ATCC12228), No productores (NP), Productor débil (PD) y productor fuerte (PF).

El punto de corte para tipificar la biopelícula y los criterios de clasificación se presentan en la tabla 6 y tabla 7 respectivamente.

Tabla 6. Densidad óptica del control negativo (DOcn) y punto de corte del control negativo (DOc).

(DOcn)	0,033
(DOc)	(DOcontrol negativo)*2 = 0.066

Tabla 7. Clasificación de producción y tipo de biopelículas: no productores (NP), productores débiles (PD) y productores fuertes (PF).

Clasificación	Criterio
NP	$DO \leq 0.066$
PD	$0.066 < DO < 0.132$
PF	$DO \geq 0.132$

La caracterización cuantitativa del tipo de biopelícula se hizo con base en el promedio de absorbancias de las seis repeticiones, los resultados obtenidos para las 66 cepas y los controles se presentan en la figura 3.

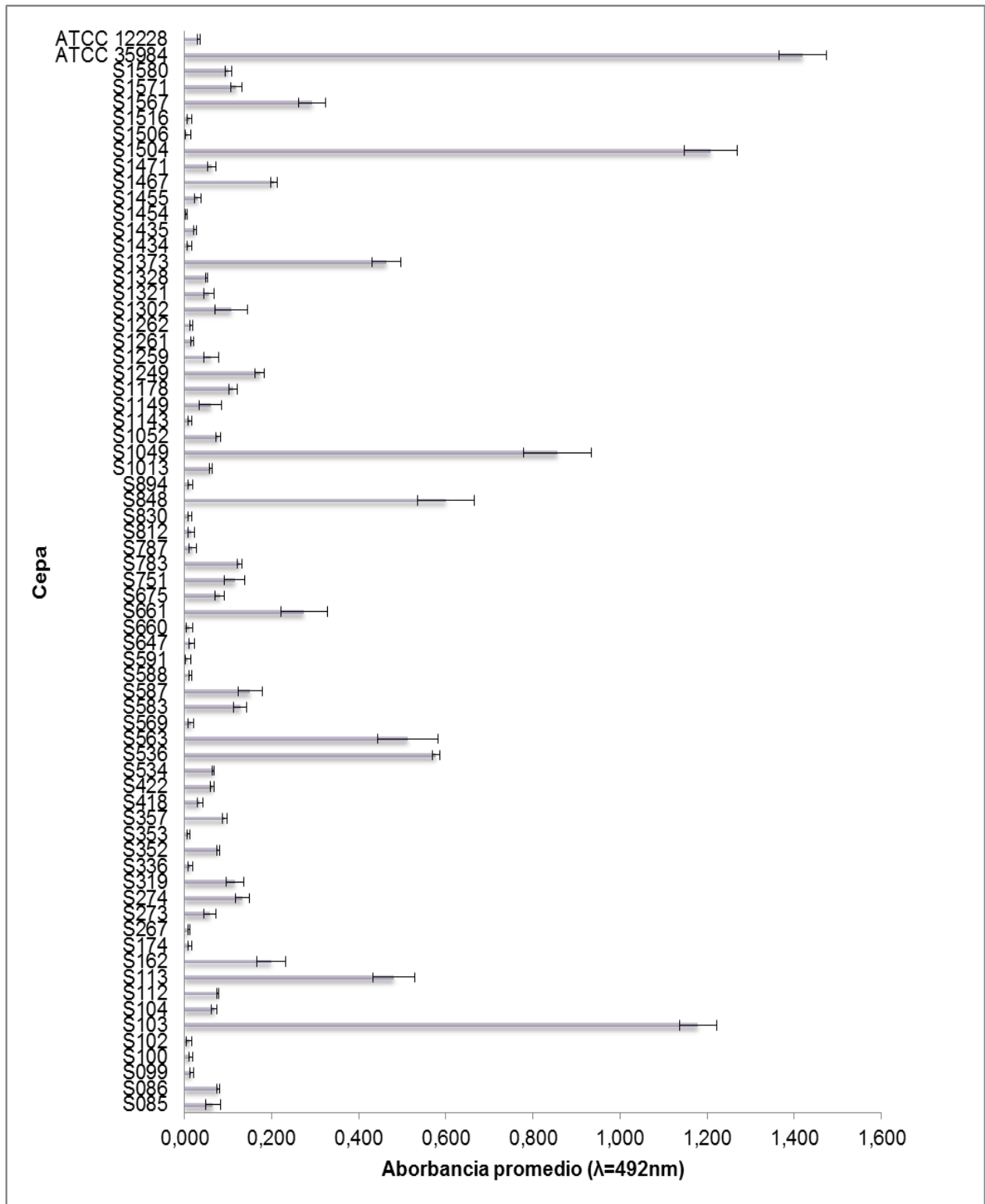


Figura 3. Prueba cuantitativa de adherencia con cristal violeta. Promedio de las seis mediciones de absorbancia para cada cepa, en donde el control positivo es *S. epidermidis* ATCC 35984 y el control negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Con base en estos criterios de caracterización se encontró que el 45% (30/66) de las cepas fueron productoras de biopelículas, de estas el 50% (15/30) se categorizaron como productoras fuertes (PF) y el otro 50% (15/30) como productoras débiles (PD).

Figura 4 y 5 respectivamente.

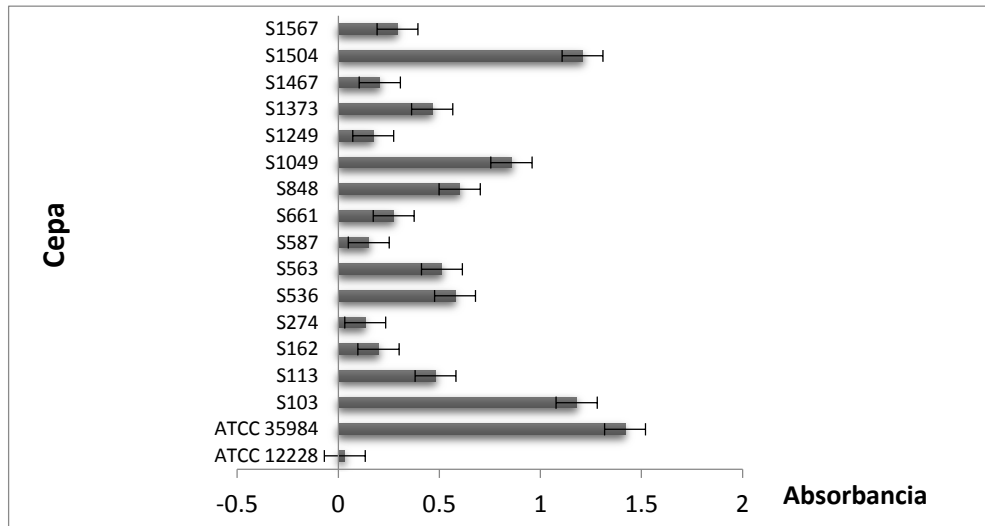


Figura 4. Representación gráfica de las cepas productoras de biopelículas fuertes (n=15) que son aquellas con una densidad óptica mayor a 0.132. También se señalan las cepas de referencia; control negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228) y control positivo (*S. epidermidis* ATCC 35984).

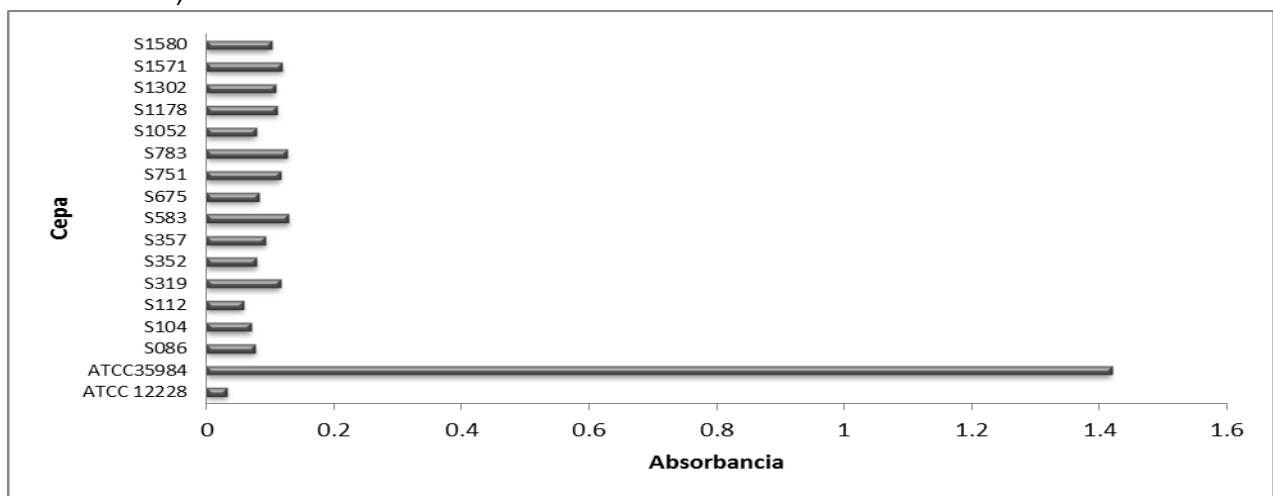


Figura 5. Representación gráfica de las cepas productoras de biopelículas DÉBILES (n=15) que son aquellas con una densidad óptica menor a 0.132 pero mayor a 0.066. También se

señalan las cepas de referencia; control negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228) y control positivo (*S. epidermidis* ATCC 35984).

7.4 Caracterización genotípica.

En la tabla 8 se presentan los resultados generales de la caracterización molecular para cada especie de SCN incluida en el estudio. Los genes incluidos en dicha caracterización son *mecA*, *SCCmec* (resistencia a oxacilina) y los relacionados con la formación de biopelículas; Operón *ica* ADCB e *ica* independiente (*aap*, *bhp* y *embp*).

Tabla 8. Resultados de la caracterización molecular de SCN.

(+): Positivo, (-): Negativo.

Las cepas sombreadas en color gris son productoras de biopelículas fuertes, las sombreadas en azul son productoras débiles y las celdas sin sombrar corresponden a cepas no productoras.

Cepa	Microorganismo	mec A	SCC mec	Genes relacionados con la formación de biofilm			
				Operón ica		Ica independiente	
				ica ADBC	aap	bhp	embp
S085	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	-	+	-
S086	<i>S. hominis</i>	+	-	-	-	+	-
S099	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S100	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S102	<i>S. hominis</i>	+	-	-	+	+	-
S103	<i>S. lentus</i>	+	IVa	+	+	+	+
S104	<i>S. epidermidis</i>	+	-	+	+	+	+
S112	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	-	+
S113	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	-	+	+
S162	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	-	+
S174	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	-	-
S267	<i>S. epidermidis</i>	+	IVd	-	+	-	+
S273	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S274	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S319	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S336	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
S352	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	+	+
S353	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	+	+
S357	<i>S. hominis</i>	+	V	-	+	-	-
S418	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+
S422	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	-	-
S534	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	-	+	-
S536	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	+	+	-	+
S563	<i>S. epidermidis</i>	+	-	+	+	-	-
S569	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S583	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	+	+	-	+
S587	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	+	+	-	+
S588	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	+	+
S591	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	+
S647	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	-	-	-
S660	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
S661	<i>S. epidermidis</i>	+	IVc	+	+	-	+
S675	<i>S. epidermidis</i>	+	-	+	-	+	+
S751	<i>S. caprae</i>	-	-	-	+	-	+
S783	<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	+	-
S787	<i>S. hominis</i>	+	IVa	-	+	-	-
S812	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	-	+	-
S830	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	-	-	-
S848	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	+	+	-	+
S894	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	-	-	-
S1013	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+
S1049	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	-	-	-
S1052	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	-	-
S1143	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	-	-	-
S1149	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	-	+
S1178	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	+	+
S1249	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	-

S1259	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	-
S1261	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
S1262	<i>S. epidermidis</i>	+	IVb	-	+	-	-
S1302	<i>S. epidermidis</i>	+	IVd	+	+	-	+
S1321	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	-	-	-
S1328	<i>S. epidermidis</i>	+	IVd	-	-	-	-
S1373	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	-	-
S1434	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	-
S1435	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	-
S1454	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	+	+
S1455	<i>S. capitis</i>	-	-	-	-	-	-
S1467	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	+	+
S1471	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	+	+
S1504	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	-	-
S1506	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	+	-	-
S1516	<i>S. haemolyticus</i>	+	-	-	-	-	-
S1567	<i>S. epidermidis</i>	+	IVc	+	+	-	-
S1571	<i>S. epidermidis</i>	+	IVa	-	-	+	-
S1580	<i>S. lugdunensis</i>	+	-	-	+	+	+

7.4.1 Amplificación genes relacionados con el biopelículas de *S. epidermidis*

Se realizó PCR dúplex para la amplificación de los cuatro genes que participan en la biosíntesis del PIA: *icaA* (103 pb), *icaB* (302 pb), *icaD* (198 pb); *icaC* (400 pb). Los cuatro genes del operón se encontraron en el 24%(16/66) de las cepas estudiadas. (Figuras: 6 y 7, Tabla 8). Los genes que codifican para las proteínas del mecanismo *ica* independiente: *aap* (510 pb), *embp* (500 pb) y *bhp* (1020 pb); se encontraron en: 65%(43/66), 48%(32/66) y 26% (17/66), respectivamente. Figuras: 8, 9, 10 y Tabla 8

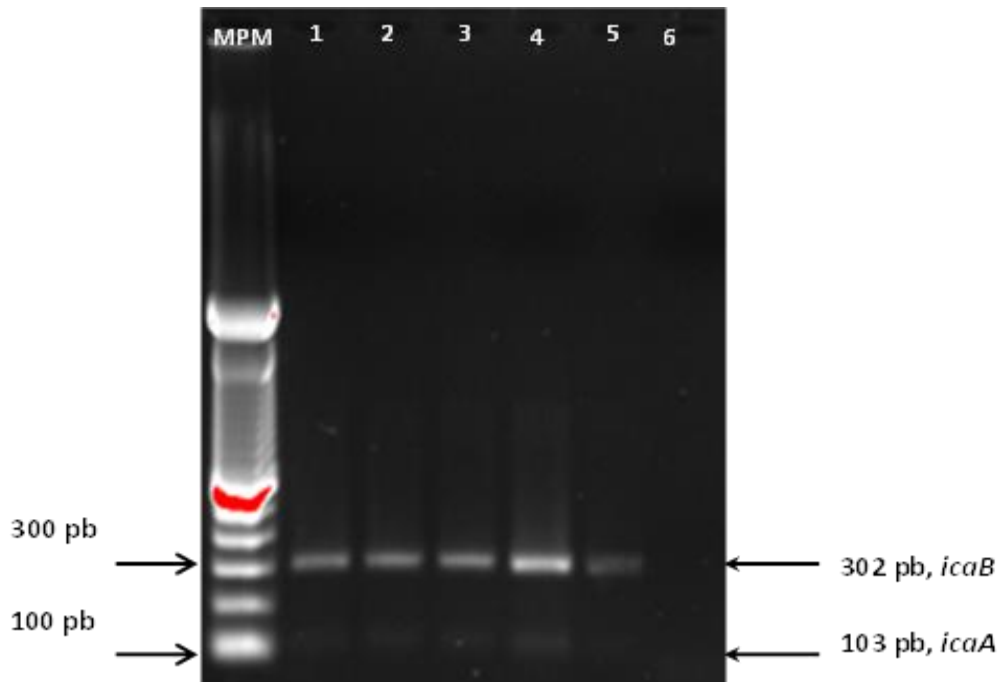


Figura 6. Electroforesis de los genes *icaA* e *icaB*:

MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Los carriles marcados del 1 a 4 son cepas de *S.epidermidis* (S563, S536, S583 y S587). Carril 5 control positivo: *S.epidermidis* ATCC35984. Carril 6 control negativo *S.epidermidis* ATCC1228.

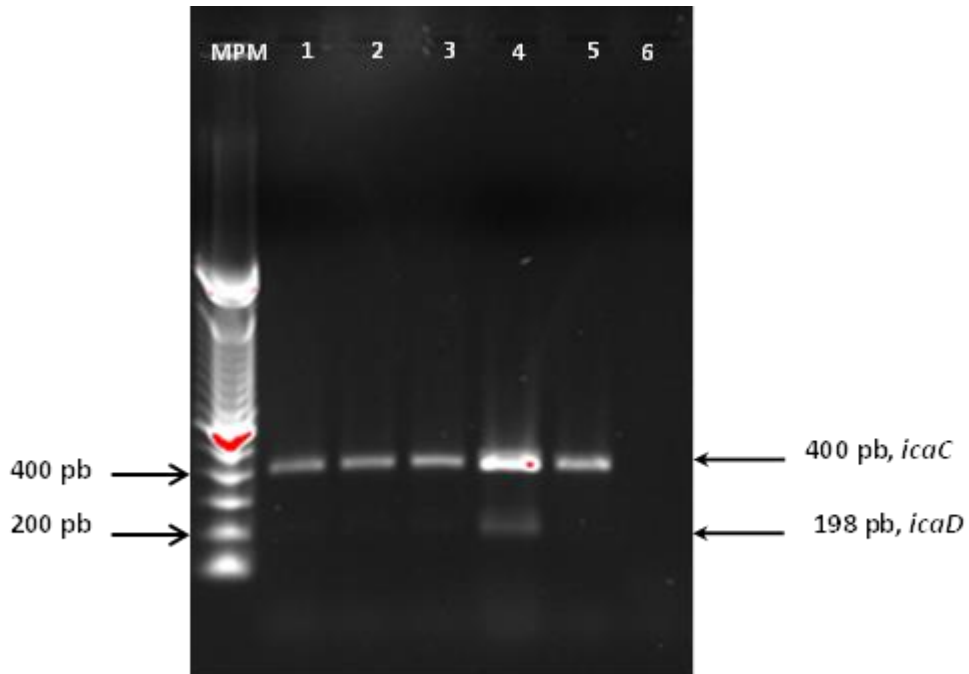


Figura 7. Electroforesis de los genes *icaC* e *icaD*:

MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Los carriles marcados del 1 a 4 cepas de *S.epidermidis* (S563, S536, S583 y S587). Carril 5 control positivo: *S.epidermidis* ATCC35984. Carril 6 control negativo *S.epidermidis* ATCC1228.

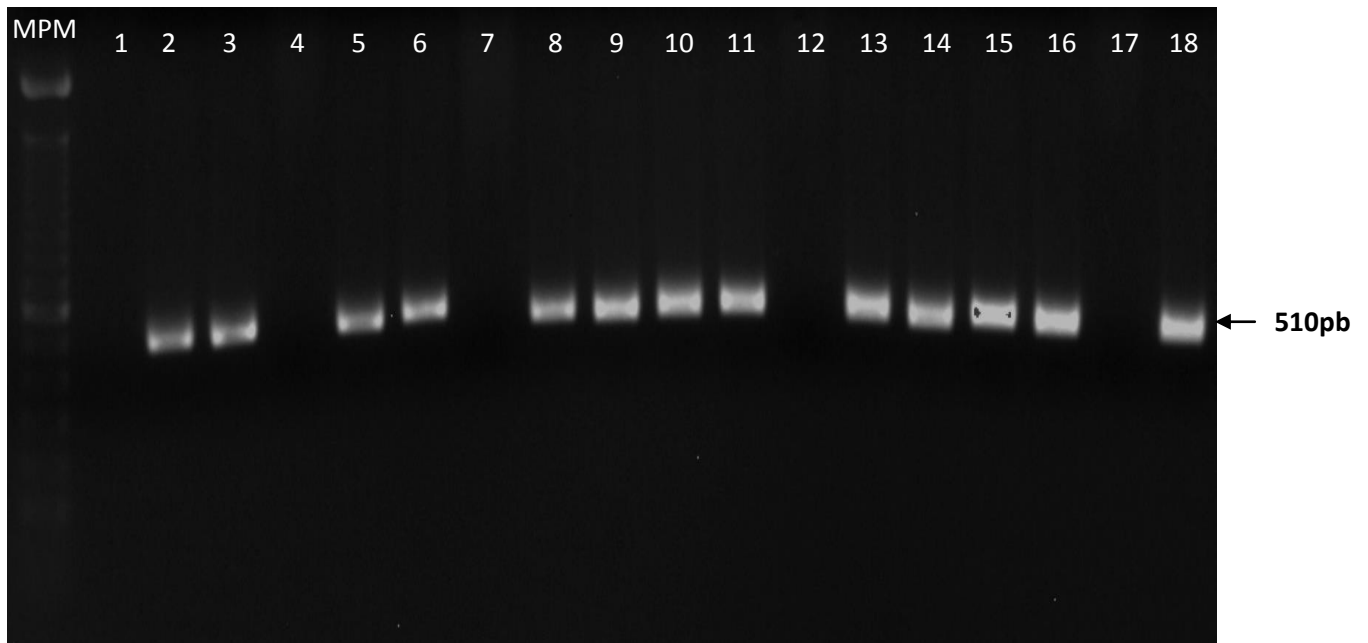


Figura 8. Electroforesis del gen *aap*.

MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Los carriles marcados del 2 al 17 pertenecen a las cepas de estudio (S099, S100, S103, S104, S113, S162, S174, S267, S273, S319, S336, S352, S353, S357, S418 y S534). El carril 1 es el control negativo *S. epidermidis* ATCC12228 y el carril 18 corresponde al control positivo *S. epidermidis* 35984.

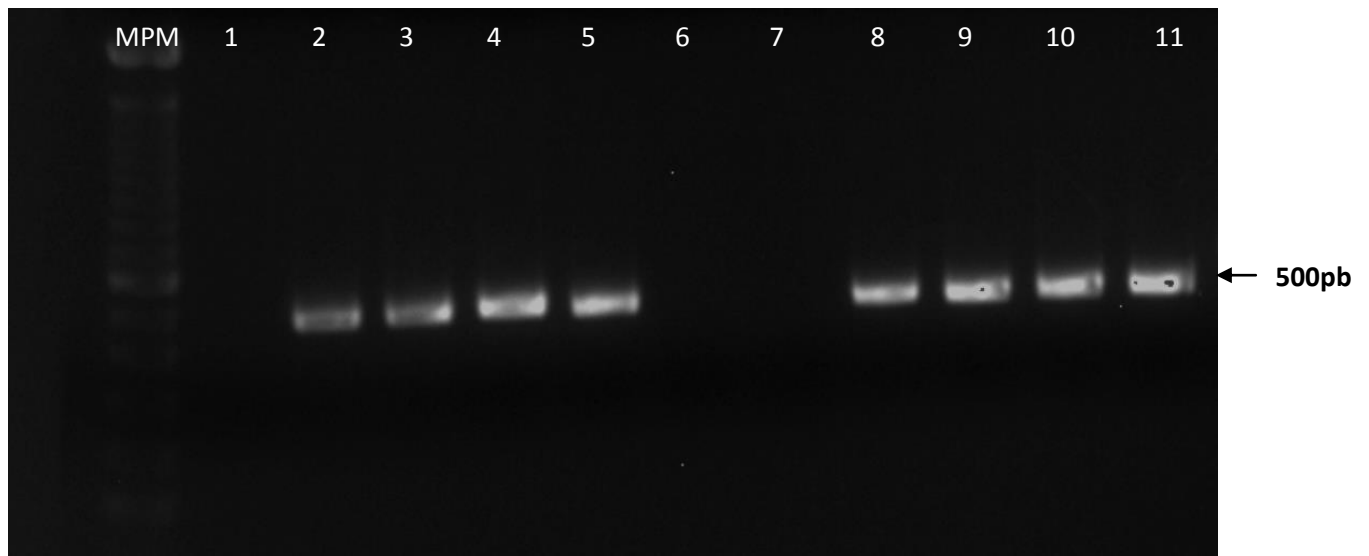


Figura 9. Electroforesis del gen *embp*:

MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Los carriles marcados del 2 al 10 pertenecen a las cepas de estudio (S099, S100, S103, S104, S102, S174, S267, S273, S274 y S319). El carril 1 es el control negativo *S. epidermidis* ATCC12228 y el carril 11 corresponde al control positivo *S. epidermidis* 35984.



Figura 10. Electroforesis del gen *bhp*:

MPM: marcador de peso molecular de 100 pb.

Los carriles marcados del 2 al 16 pertenecen a las cepas de estudio (S099, S102, S112, S162, S174, S267, S273, S274, S319, S336, S357, S352, S353, S418 y S534). El carril 1 es el control negativo *S. epidermidis* ATCC12228 y el carril 17 corresponde al control positivo *S. epidermidis* 35984.

7.4.2 Amplificación del gen *mecA*

La resistencia a oxacilina fue corroborada con la amplificación del gen *mecA*. El 77% (51/66) de las cepas resistentes a oxacilina también tenían el gen *mecA*, (**Figura 11 y 12**). Se tipificaron molecularmente las 51 cepas *mecA* (+) para determinar a que cassette estafilocócico cromosomal (*SCCmec*) pertenecían. Se encontró que el *SCCmec* de tipo IVa fue el más frecuente en las cepas estudiadas (Tabla 9, Figuras 13, 14 y 15).

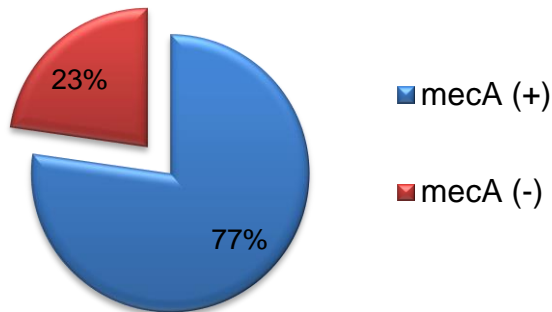


Figura 11. El 77% de las cepas fueron resistentes a oxacilina, de los cuales todos tenían el gen *mecA*.

Tabla 9. Distribución del tipo de *SCCmec* en las 51 cepas resistentes a oxacilina.

Tipo de <i>SCCmec</i>	No. de cepas
<i>SCCmec</i> IVa	26
<i>SCCmec</i> IVb	1
<i>SCCmec</i> IVc	2
<i>SCCmec</i> IVd	3
<i>SCCmec</i> V	1
ND	18

*ND. No se detectó

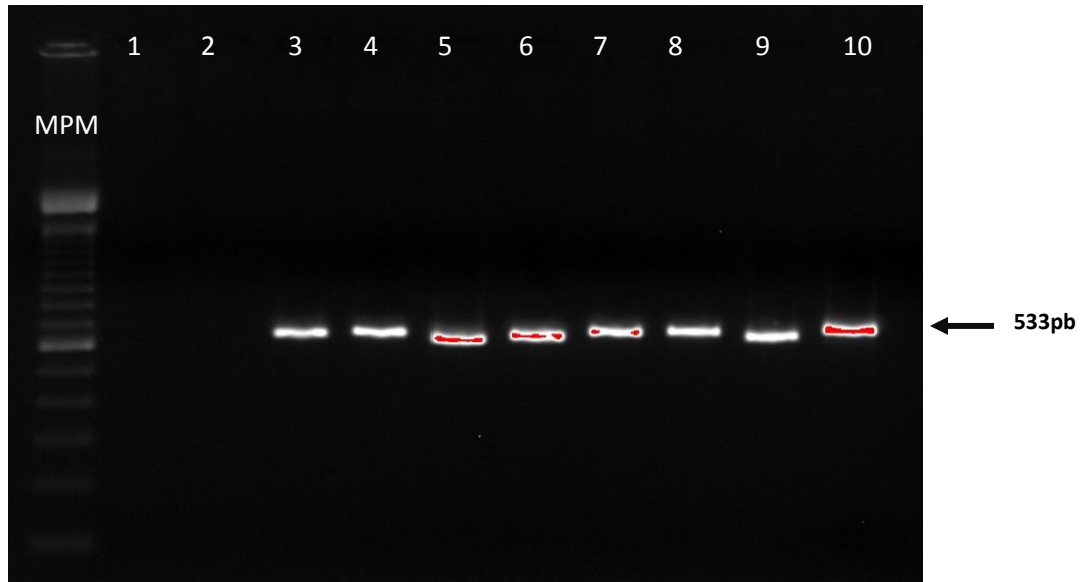


Figura 12. Electroforesis del gen *mecA*. MPM: marcador de peso molecular de 100pb. El carril marcado con el número 1 pertenece al control negativo y el marcado con el número 10 al control positivo: *S. aureus* ATCC 43300. Los carriles 2 al 9 corresponden a las cepas de estudio (S112, S174, S267, S273, S274, S319, S352 y S357)

Las figuras 13, 14 y 15 corresponden a la amplificación del cassette estafilocócico cromosomal en las cepas resistentes a oxacilina.

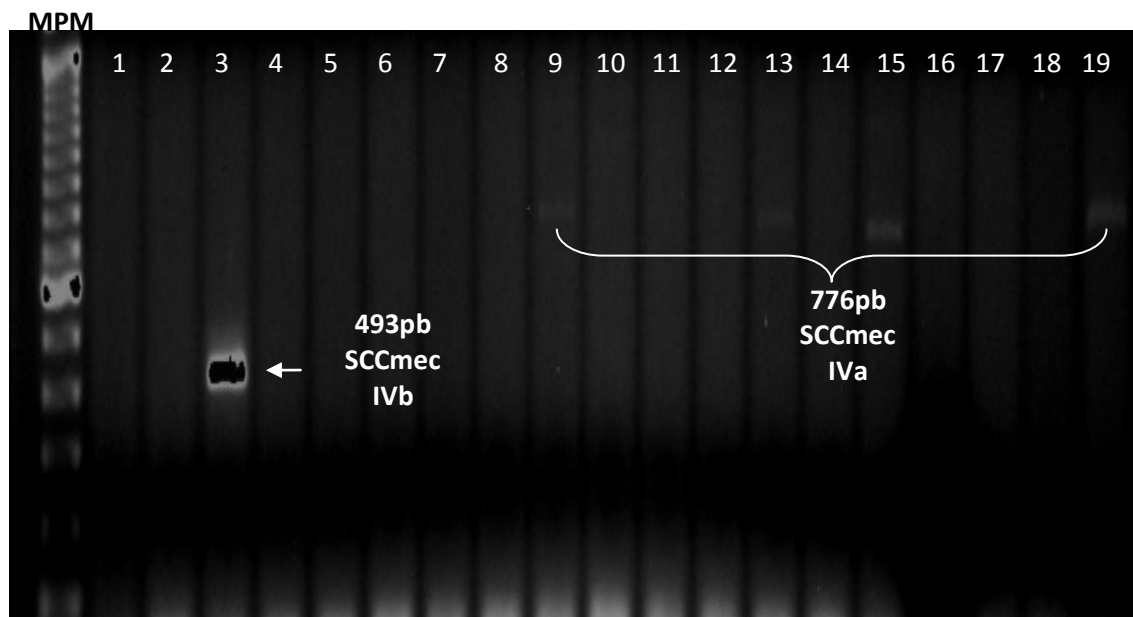


Figura 13. Electroforesis para tipificar *SCCmec* IVa y IVb

MPM: marcador de peso molecular de 100pb. Los carriles 1 al 19 pertenecen a las cepas de estudio (S086, S102, S1262, S104, S112, S113, S162, S174 S085, S336, S352, S353, S273,

S418, S274, S675, S751, S783 y S787) y se encontró que en el carril 3 hay una banda correspondiente al SCCmec IVb (493pb) y en los carriles 9, 13 y 15 bandas de 776pb que corresponden al SCCmec de tipo IVa.

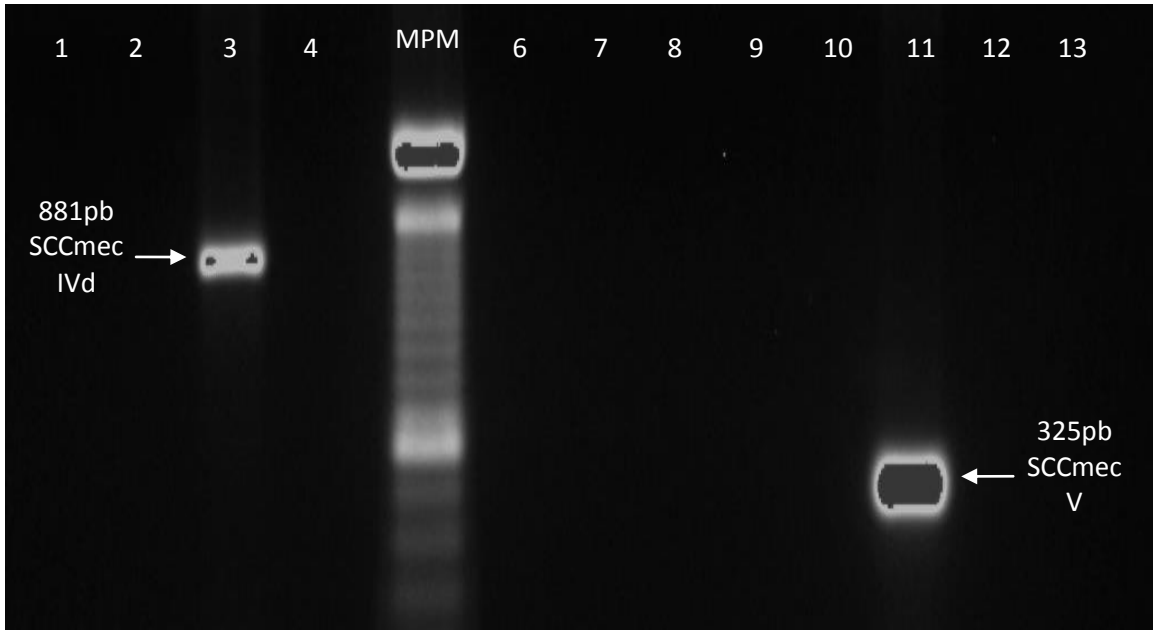


Figura 14. Electroforesis para tipificar SCCmec IVd y V

MPM: marcador de peso molecular de 100pb. Todos los carriles pertenecen a las cepas de estudio (S085, S086, S267, S273, S274, S319, S534, S536, S357, S583 y S587). En el carril 3 se muestra la banda correspondiente al SCCmec IVd (881pb) y en el 14 se observa la amplificación del SCCmec V (325pb).

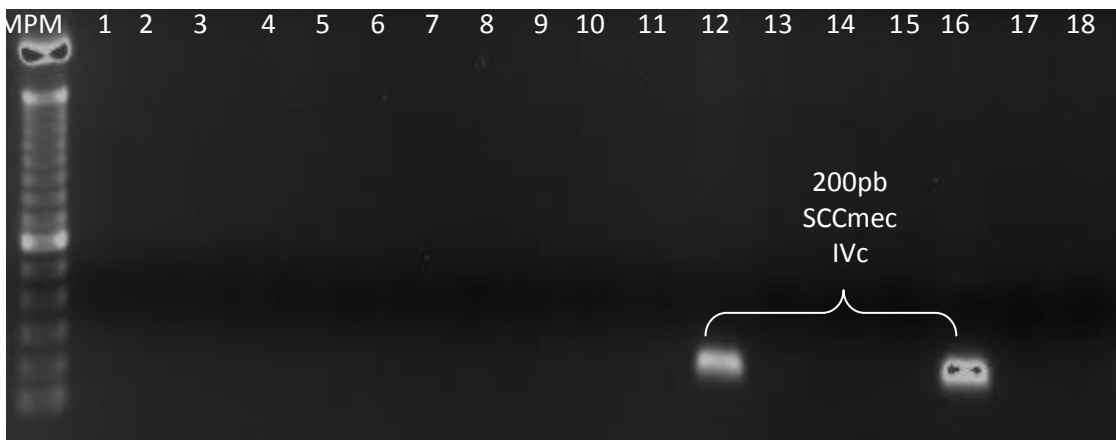


Figura 15. Electroforesis para tipificar SCCmec IVc.

MPM. Marcador de peso molecular de 100pb. Todos los carriles pertenecen a las cepas de estudio (Positivos S661 y S1567) y tal como se observa en los carriles 12 y 16 se encontró una banda de 200pb que corresponde al SCCmec de tipo IVc.

8. Discusión.

En los últimos años las infecciones de prótesis articulares (IPA), se han caracterizado como una de las principales complicaciones asociadas a los procedimientos de reemplazo articular. Con base en la literatura consultada se encontró que los agentes etiológicos que se aíslan con mayor frecuencia en este tipo de infecciones son microorganismos del género *Staphylococcus spp*^{5,90,91}.

De acuerdo a un estudio publicado por Tande y col. se reporta al grupo de los *Staphylococcus* coagulasa negativos como la causa más común de IPA (13-42% de los casos). Dicho estudio contempla 1,979 casos de reemplazo articular de cadera y 1,427 de rodilla recopilados de la base de datos de la Clínica Mayo (Arizona, EUA). Al comparar esta distribución de SCN con la reportada en publicaciones de estudios realizados en el Instituto Nacional de Rehabilitación se encontraron resultados muy similares (SCN en el 31% de los casos)^{3,24}.

En el presente trabajo se incluyeron solo aquellas cepas pertenecientes al grupo de los SCN, aisladas de IPA en un período de tres años (n=66). Se encontró a *S. epidermidis* como el principal agente causal (83% de los casos), seguido por *S. hominis* (8%), y otros microorganismos de este grupo en menor proporción (Tabla 4). La distribución de especies de SCN reportada en la literatura coincide en que *S. epidermidis* es el agente etiológico de mayor incidencia^{10,11,87}. En tanto que *S. lugdunensis*, *S. hominis* y *S. capitis* han sido muy estudiadas en los últimos años debido a que también son muy frecuentes^{11,91,94}.

Un problema importante en este grupo de microorganismos es que han desarrollado altos porcentajes de resistencia a los antibióticos, principalmente a aquellos de primera

línea.⁹² La incidencia de las IPA causada por bacterias multidrogo resistentes ha aumentado drásticamente en la última década, probablemente debido al uso excesivo y, a menudo inadecuado, de antibióticos⁹⁵. La resistencia bacteriana a múltiples clases de antimicrobianos complica notablemente el tratamiento de las IPA con respecto a las infecciones causadas por organismos sensibles, lo que da como resultado un aumento de la morbilidad y los costos.⁹⁶

En un estudio publicado por Drago y col. en el que se evaluó el perfil de susceptibilidad en 124 cepas de SCN involucradas en infecciones de prótesis articulares, se encontró una alta resistencia a penicilinas (90.3%), así mismo como a las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino) y macrólidos, que mostraron una actividad significativa contra cepas estafilocócicas con tasas de resistencia de entre 45,2% y 41,5%, respectivamente. Como era de esperarse, los antibióticos más activos fueron linezolid y glicopéptidos: todos los aislamientos fueron susceptibles a linezolid y vancomicina, mientras que solo un aislado de *S. epidermidis* resultó resistente a la teicoplanina. La conclusión en dicho estudio fue que el 59,3% de aislamientos de *S. epidermidis* y el 30,4% de otros SCN fueron resistentes a al menos tres clases de antibióticos.⁹⁵

Los resultados reportados por Drago y col. son equiparables con los encontrados en este trabajo, ya que como se presenta en la **Tabla 5** los SCN incluidos presentaron una alta tasa de resistencia a penicilinas y fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino y mixifloxacino) principalmente. En tanto que para vancomicina y linezolid no se encontraron cepas resistentes. La diferencia más significativa fue que se encontró que el 10% de los aislados fue resistente a teicoplanina.

Con respecto al patrón de resistencia entre especies, ambos estudios coinciden en que *S. epidermidis* es el microorganismo más resistente, seguido por *S. hominis* y *S. lugdunensis*; en tanto que para las otras especies, los resultados son variables.⁹⁵

Debido a que el abordaje terapéutico inicial de las IPA es generalmente empírico, y la única forma de dirigir el tratamiento antimicrobiano es aislando el agente causal, el conocimiento de los patrones de resistencia de los microorganismos más frecuentemente involucrados en IPA a nivel local puede ayudar a optimizar el tratamiento empírico.^{5,11,96}

Como se mencionó, uno de los principales problemas en las IPA causadas por SCN es su alta tasa de resistencia a los antibióticos de primera elección, como las penicilinas, más específicamente la oxacilina.^{50,51} Su resistencia es mediada por la presencia del gen *mecA*, cuya transmisión ocurre muy fácilmente entre las especies de SCN; principalmente las que son de origen nosocomial.⁵² En la **Tabla 5** se puede observar que el 77% de las cepas resistentes a oxacilina, todas poseían el gen *mecA*. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros autores, en donde se reportan tasas de resistencia a oxacilina de entre 70 y 80%, dependiendo de la especie, la cual es mediada por dicho gen.^{11,98}

En los últimos años, el papel de integrones y cassettes génicos en la difusión de la resistencia a los antibióticos entre las bacterias patógenas ha sido bien documentado.⁷⁴

Tal es el caso del elemento genético móvil de transferencia horizontal conocido como *SCCmec* (resistencia a oxacilina), del cual se han reportado al menos 11 tipos diferentes pero los más comunes en SCN son los del I al V (según la literatura consultada).^{54,57,76,77} En este trabajo se encontró que la mayoría de las cepas tenían el cassette de tipo IVa (51%), IVb (2%), IVc (4%) y IVd (6%), y el tipo V (2%), aunque

desafortunadamente en el 35% de las cepas no se logró determinar debido a que no se contaba con todos los primers y solo se buscaron los *SCCmec* de tipo I, II, III, IV y V. Aun cuando no se consiguió tipificar a todas las cepas *mecA* (+), se puede concluir que el *SCCmec* más frecuente en la población de estudio fue el de tipo IV, y estos resultados coinciden con lo reportado por Zhang y col.⁸⁵

De acuerdo con estudios de epidemiología molecular realizados en SCN aislados de distintos tipos de infecciones se ha visto que estos están armados con un arsenal de genes que le ayudan a formar biopelículas en distintos tipos de superficies (vivas e inertes), las cuales les ayudan a sobrevivir en ambientes extremos (carencia de nutrientes) y a tolerar moléculas con actividad antimicrobiana, favoreciendo el desarrollo de infecciones crónicas.^{60,63,66} Los principales mecanismos moleculares asociados a la biosíntesis de biopelículas son: el operón *icaADCB* (síntesis de PIA) y una vía alterna denominada PIA independiente, en la que están involucradas tres proteínas que tienen relación con las fases de adhesión y acumulación (Aap, Bhp y Embp).²³

En este estudio, antes de buscar las características genéticas asociadas a la capacidad de formar biopelículas en los SCN, se buscó caracterizar fenotípicamente a las cepas productoras de biopelículas, mediante la prueba semicuantitativa de adherencia con cristal violeta propuesta por Christensen y col., en la que se clasificó a los SCN de acuerdo a su capacidad de formar biopelículas y a la intensidad de las mismas (Figura 4), siguiendo los criterios de Stepanovic y col. (**Tabla 7**). Se encontró que el 45% de las cepas fueron productoras de biopelículas, de las cuales el 50% se categorizaron como productoras fuertes (**Figura 4**) y el otro 50% como productoras débiles (**Figura 5**). De las cepas que produjeron biopelículas fuertes el 93% eran *S. epidermidis* y un hubo un

solo aislado de *S. lentus*, mientras que de 15 cepas productoras de biopelículas débiles, 10 eran *S. epidermidis* (66%), 3 *S. hominis* (20%), 1 *S. lugdunensis* (7%) y 1 *S. caprae* (7%).

Como se presenta en la **Tabla 8** los cuatro genes que participan en la biosíntesis del PIA (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) se encontraron en 12 de las 15 cepas productoras de biopelículas fuertes (75%), mientras que para las productoras débiles sólo se encontró en 5 de 15 (33%). La biosíntesis de poli-N- acetilglucosamina, era hasta hace unos años el principal marcador de virulencia en los microorganismos productores de biopelículas⁷², debido a que forma parte de la matriz extracelular que protege a las bacterias de la acción de antimicrobianos y de la respuesta inmune del huésped, aunque como se describió anteriormente también hay factores proteicos que intervienen en la fase de acumulación y por lo tanto, tienen una función homóloga en la formación de biopelículas^{101,102}.

Entre las proteínas mejor estudiadas se encuentra Aap, cuya expresión está muy relacionada con la fase de acumulación debido a que tiene la propiedad de mediar la adhesión intercelular, lo que induce a la formación de agregados bacterianos más grandes y por lo tanto fenotípicamente se asocia con biopelículas fuertes.^{23, 84} Tal como se presenta en la **tabla 8**, el gen *aap* que codifica para la proteína Aap se encontró en el 65% de las cepas, de las cuales el 80% produjeron biopelículas. Además las 3 cepas productoras de biopelículas fuertes que no tenían el operón *icaADCB*, si presentaron este gen. Por otra parte los SCN que poseían ambos mecanismos, produjeron biopelículas de mayor intensidad (**Figura 4**), lo que sugiere que su asociación contribuye a la formación de biopelículas más resistentes.

Con respecto a los genes *embp* y *bhp* se encontraron en el 48% y 26% de las cepas, respectivamente, principalmente en las cepas que produjeron biopelículas débiles o en aquellas no productoras. El mecanismo de acción de las proteínas codificadas por estos genes es muy similar a *aap*, ya que promueven la adhesión intercelular, por lo que también están involucradas en la fase de acumulación.^{48,49,50} Hay estudios que indican que su presencia es suficiente para producir biopelículas en ausencia de *icaADCB*, aunque en este trabajo se encontraron tres cepas de *S. hominis* que solo tenían el gen *bhp* y produjeron biopelículas débiles (**Tabla 8**) y ningún caso de *embp*. Sin embargo, el conocimiento de la capacidad de *S. hominis* para formar un biopelículas aún es limitado; Szczuka et al. señalan en un estudio realizado en el 2015 en 56 cepas de *S. hominis*, que *icaADCB* fue el principal mecanismo asociado a la producción de biopelículas¹⁰³, por lo tanto no se puede buscar una relación directa, debido a que solo se trabajó con 5 aislados de esta especie.

Conclusiones

- Los SCN son la causa más común de IPA; *Staphylococcus epidermidis* es el agente causal encontrado con mayor frecuencia, seguido por *S. lugdunensis* y *S. hominis*.
- Los *Staphylococcus* coagulasa negativos asociados a IPA presentaron altos porcentajes de resistencia a antibióticos, principalmente a penicilinas y quinolonas.
- La resistencia a oxacilina es un grave problema en el tratamiento de pacientes con IPA, debido a que es uno de los antibióticos de primera elección y se transmite entre cepas de origen nosocomial mediante un elemento génico móvil.
- El SCCmec encontrado con mayor frecuencia en la población de estudio fue el de tipo IVa.
- Se encontró que el principal mecanismo asociado a la producción de biopelículas fuertes es el operón icaADCB.
- En general los resultados de este estudio muestran que al menos las cepas que nosotros estudiamos presentan alta diversidad genética, principalmente en la presencia de genes asociados a biopelículas,

Referencias

1. Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y tratamiento de las infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos y/o material de osteosíntesis. México: Secretaría de Salud, 2013.
2. Anthony R. Berendt, et. al, Prosthetic Joint infection, *Current Infection Disease Reports* (1999), 1:267–272
3. Ortega-Peña S, Colín-Castro C, Hernández Duran M, López-Jácome E, Franco Cendejas R, *Características microbiológicas y patrones de resistencia en infecciones de prótesis articulares en un hospital de referencia*, *Cirugía y cirujanos*, 2015, pp 371-377.
4. Barberán J, Bouza E, Aguado J, Azanza J, García J, Prieto J, *Diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección de prótesis articulares*, *Revista Española de Quimioterapia*, Diciembre 2003; Vol.16 (Nº 4): 467-478.
5. Aaron J, Robin P, Prosthetic Joint Infection, *Clinical Microbiology Reviews* (2014), pp 302-345.
6. Steven K, *Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection*, *Perioperative Manegement of patients with Rheumatic Disease* (2012), pp 261-269.
7. Rupp ME, Fey PD. *Staphylococcus epidermidis* and other Coagulase-Negative Staphylococci. In Bennett, Dolin and Blaser (Eds). *Principle and Practice of Infectious Diseases*. 8th edition, Elsevier, Philadelphia PA, 2015. P2272-2282

8. Saima A, Rabih O, Prosthetic Joint Infection, *Current Infection Disease Reports* (2012), 14:551–557
9. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE, Prosthetic Joint Infection, *N Engl J Med*, 2004; 351:1645-54.
10. Ariza J, Gorane E, Murillo O, Infecciones relacionadas con las prótesis articulares, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2008; 26(6): 380-90.
11. Karsten B, Christine H, Georg P, *Coagulase Negative Staphylococci*, *Clinical Microbiology Reviews* (2014), pp 870-926
12. Cunha M L, Rugolo L M, Lopes C A. *Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 661-8.
13. Rak M, Kavcic M, Trebse R, Co RA. Detection of bacteria with molecular methods in prosthetic joint infection: sonication fluid better than periprosthetic tissue. *Acta Orthop*. 2016; 87:339–345.
14. Portillo ME, Salvado M, Alier A, Martinez S, Sorli L, Horcajada JP, Puig L. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Infect*. 2014; 69:35–41.

15. Bannerman, T. L., Kleeman, K. T., & Kloos, W. E., Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. (1993). *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1322–1325.
16. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:2932–2939.
17. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*. 2005; 135:243–251.
18. Fajardo M, Hidalgo R, Gaitán J, Sánchez-Silos R, Martín-Cordero P., About microbiological methods for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci, *Rev Esp Quimioter*. 2016 Oct; 29(5):244-8.
19. Arslan S, Özkardes F. *Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 29-33.
20. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Scott J, *Bacterial Biofilms: Development, Dispersal and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era*, *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Apr; 3(4): a010306.

21. Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, Malm A, et al, *A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of S. epidermidis*, FEMSM MicrobiolLett, 2010; 310 (2): 97-103.
22. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex.* 2010; 54 (1): 14-24.
23. Otto M. *Staphylococcal biofilms*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 207-228.
24. Ortega-Peña S, Franco R, *Importancia médica del biofilm de Staphylococcus epidermidis en las infecciones de prótesis articular*, *Investigación en Discapacidad Vol 3*, 2014, pp 106-114
25. Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H. 2011. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect. Immun.* 79:2267–2276. 10.1128/IAI.01142-10
26. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:470–476. 10.1128/AEM.02073-07

27. Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. 2005. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect. Immun.* 73:3007–3017. 10.1128/IAI.73.5.3007-3017.2005
28. Ribeiro M, Monteiro F, Ferraz M, *Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions*, *Biomatter*. 2012; 2(4): 176–194.
29. Kloos WE, Bannerman TL. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:117–140
30. Pfaller MA, Herwaldt LA. 1988. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:281–299
31. Chagnot C, Listrat A, Astruc T, Desvaux M: Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cell Microbiol.* 2012; 14(11):1687-96.
32. O'Gara JP: *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS MicrobiolLett.* 2007; 270(2): 179-88.
33. Kong, K. F., Vuong, C. & Otto, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 133–139 (2006).

34. Waters, C. M. & Bassler, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346 (2005).
35. Novick, R. P. & Geisinger, E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42, 541–564 (2008).
36. Nadell, C. D., Drescher, K. & Foster, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 589–600 (2016).
37. McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60 (12): 1551-1571.
38. Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA, Stewart PS (2004) Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl Environ Microbiol* 70: 7418–7425.
39. Cuong Vuong, Christiane Gerke, Greg A. Somerville, Elizabeth R. Fischer, Michael Otto; Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003; 188 (5): 706-718
40. Boles BR, Horswill AR (2008) agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog* 4(4).

41. Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int J Artif Organs*. 2005; 28 (11): 1069-1078.

42. Gerke C, Kraft A, Süssmuth R, Schweitzer O, Götz F., Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17; 273(29):18586-93.

43. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M., A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence, *J Biol Chem*. 2004 Dec 24; 279(52):54881-6.

44. Rohde H, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*. 2007; 28:1711–1720.

45. Rohde H, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*. 2005; 55:1883–1895.

46. Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perdreau-Remington F, Peters G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun*. 1997; 65:519–524.

47. Conlon B., Geoghegan J.A., Waters, E.M., McCarthy, H., Davies J.R., Schaeffer C.R., Foster T.J., Fey P.D., and J.P. O’Gara. 2014. A role for the A-domain of unprocessed accumulation associated protein (Aap) in the attachment phase of the *Staphylococcus epidermidis* biofilm phenotype. *J. Bacteriol.* 196(24)4268-4275.
48. Schaeffer C.R., Woods K.M., Longo G.M., Kiedrowski M.R., Büttner H., Christner M., Horswill A.R., Rohde H. and P.D. Fey. 2015. Accumulation-associated protein (Aap) enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. *Infect and Immun.* 83:1 214-226
49. Zhang YQ, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228) *Mol Microbiol.* 2003; 49:1577–1593.
50. Gill SR, et al. 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.* 2005; 187:2426–2438.
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.* 46:3778–3783. 10.1128/JCM.02262-07

52. Zong Z, Peng C, Lü X. 2011. Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS One*
53. 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.* 44:1549–1555.
54. Ito T, Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines of Reporting Novel SCCmec Elements, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, p. 4961-4967.
55. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. 2005. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 43:4751–4757. 10.1128/JCM.43.9.4751-4757.2005
56. Monecke S, Müller E, Schwarz S, Hotzel H, Ehricht R. 2012. Rapid microarray-based identification of different mecA alleles in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5547–5554.
57. 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.* 47:3574–3579. 10.1128/AAC.47.11.3574-3579.2003

58. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. 2008. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. J. Clin. Microbiol. 46:118–129. 10.1128/JCM.01685-07
59. Spanu T, Sanguinetti M, Ciccaglione D, D'Inzeo T, Romano L, Leone F, Fadda G. 2003. Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections. J. Clin. Microbiol. 41:4259–4263. 10.1128/JCM.41.9.4259-4263.2003
60. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. 37:318–326
61. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. 178:175–183
62. Hirschhausen N, Schlesier T, Peters G, Heilmann C. 2012. Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin Aaa from *Staphylococcus aureus*. PLoS One 7:e40353. 10.1371/journal.pone.0040353
63. Allignet J, Aubert S, Dyke KG, El Solh N. 2001. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an

- autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* 69:712–718. 10.1128/IAI.69.2.712-718.2001
64. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM. 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.* 187:2426–2438. 10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005
65. Macintosh RL, Brittan JL, Bhattacharya R, Jenkinson HF, Derrick J, Upton M, Handley PS. 2009. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J. Bacteriol.* 191:7007–7016. 10.1128/JB.00764-09
66. McKenney D, Hübner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB. 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* 66:4711–4720
67. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67:5427–5433
68. Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, Goldmann DA, III, Pier GB. 2002. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-

- acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* 70:4433–4440. 10.1128/IAI.70.8.4433-4440.2002
69. Frank KL, Patel R. 2007. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect. Immun.* 75:4728–4742. 10.1128/IAI.00640-07
70. Fey P, Olson M, *Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis*, *Future microbiology* 2010, pp. 917-936
71. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, Tigaud S, Vandenesch F, Etienne J, Ferry T, Laurent F. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One* 8:e67240. 10.1371/journal.pone.0067240
72. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. 2002. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 184:4400–4408. 10.1128/JB.184.16.4400-4408.2002
73. 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.* 44:1549–1555. 10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000

74. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsubishi M, Konno M. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J. Bacteriol.* 171:2882–2885
75. Schoenfelder SM, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W: Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(6):380-6.
76. 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 encoding highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ* and *ccr* genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3765–3773. 10.1128/AAC.00187-11
77. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4961–4967. 10.1128/AAC.00579-09
78. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66:86–92
79. Hanssen AM, Kjeldsen G, 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. 48:285–296.
10.1128/AAC.48.1.285-296.2004

80. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L. M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E. H., *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices*, 1985, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 22, Pág. 996-2006.
81. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic M, *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*, Journal of Microbiological Methods 40 (2000), 175-179
82. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE, *Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay*, J Clin Microbiol, 2002 A; 4 (8): 2786-90.
83. Arciola GR, Gamberini S, Campoccia D, Visal L, Speziale P, Baldassari L, Montanaro L, *A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in Staphylococcus epidermidis. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections*, J Biomed Mater Res A. 2005 Nov 1;75(2):408-413.
84. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D. 2005. *Induction of Staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-*

associated protein by staphylococcal and host proteases. Mol. Microbiol. 55:1883–1895. 10.1111/j.1365-2958.2005.04515.x

85. Zhang, K., McClure, J., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J. (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, 5026-5033.

86. Dale H, Fenstad AM, Hallan G, Havelin LI, Furnes O, Overgaard S, Pedersen AB, Karrholm J, Garellick G, Pulkkinen P, Eskelinen A, Makela K, Engesaeter LB. 2012. *Increasing risk of prosthetic joint infection after total hip arthroplasty.* Acta Orthop. 83:449–458.

87. Tsaras G, Osmon DR, Mabry T, Lahr B, St Sauveur J, Yawn B, Kurland R, Berbari EF. 2012. *Incidence, secular trends, and outcomes of prosthetic joint infection: a population-based study, Olmsted county, Minnesota, 1969-2007.* Infect. Control Hosp. Epidemiol. 33:1207–1212.

88. Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ, Berry D, Parvizi J. 2010. *Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population.* Clin. Orthop. Relat. Res.

89. Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. 2008. *Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors.* Clin. Orthop. Relat. Res. 466:1710–1715.

90. Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. 2014. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci. *mBio* 5(5):e01910-14. doi:10.1128/mBio.01910-14.
91. S. Tevell, B. Hellmark, Å. Nilsson-Augustinsson, B. Söderquist, *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2017) 36:115–122
92. Cabrera-Contreras R, Morelos-Ramírez R, Galicia-Camacho AN, Meléndez-Herrada E: Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Staphylococcus epidermidis* Strains, Isolated from a Tertiary Care Hospital in Mexico City. *ISRN Microbiol.* 2013;918921.
93. Werner Zimmerli, Claus Moser, *Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections*, *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2012) 158–168
94. Kristi L. Frank , Patel R, Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by icaA⁺-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates, *Infection and Immunity*, Oct. 2007, p. 4728–4742
95. Drago L., De Vecchi E., Cappelletti L, Roberto M., Vassena C., Romano C., *Role and antimicrobial resistance of staphylococci involved in prosthetic joint infection*, *Int J Artif Organs* 2014; 37 (5): 414-421

96. Martins A, Riboli DF, Camargo CH, Pereira VC, de Almeida Sampaio R, de Souza da Cunha Mde L: Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. *DiagnMicrobiol Infect Dis.* 2013;77(2):164-8
97. Ravi S., Zhu M., Luey C., Young SW., *Antibiotic resistance periprosthetic joint infection*, *ANZ Journal of Surgery*, 86: 1014–1018
98. Tokars JI. 2004. Predictive value of blood cultures positive for coagulase negative staphylococci: implications for patient care and health care quality assurance. *Clin. Infect. Dis.* 39:333–341.
99. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, Jabbouri S. 2006. *Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci.* *Int. J. Med. Microbiol.* 296:381–388.
100. Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ, Herr AB. 2008. *A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 19456–19461.
101. Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaoli, S., & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 7.

102. Frank KL, Patel R. 2007. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBCpositive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect. Immun.* 75:4728–4742.

103. Szczuka, E., Telega, K. & Kaznowski, *Biofilm formation by Staphylococcus hominis strains isolated from human clinical specimens*, *A. Folia Microbiol* (2015) 60: 1.