

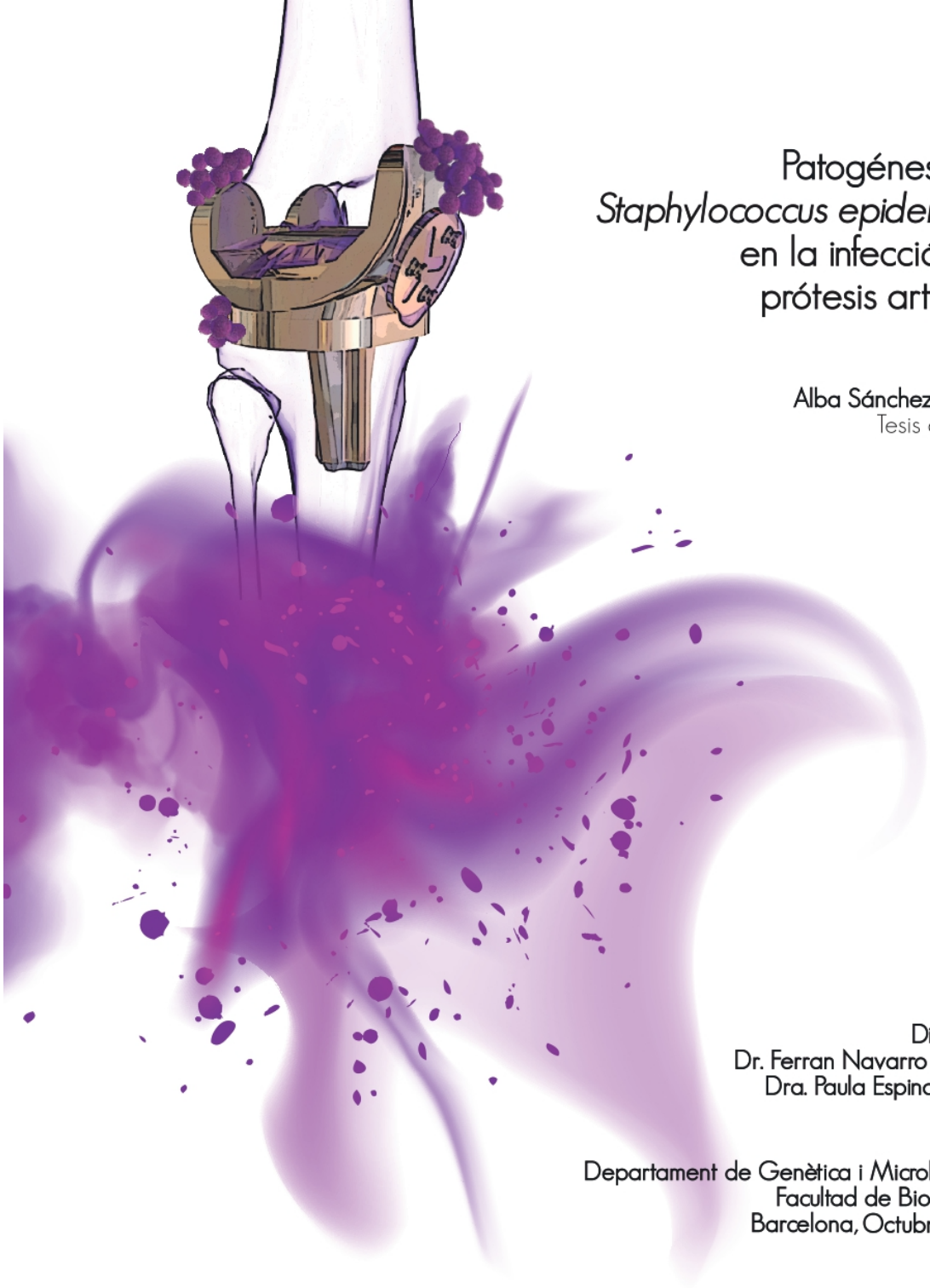


Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Patogénesis de  
*Staphylococcus epidermidis*  
en la infección de  
prótesis articular

Alba Sánchez Morillo  
Tesis doctoral

Directores  
Dr. Ferran Navarro Risueño  
Dra. Paula Espinal Marín

Departament de Genètica i Microbiologia  
Facultat de Biociències  
Barcelona, Octubre 2020



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Patogénesis de *Staphylococcus epidermidis* en la  
infección de prótesis articular**

**Tesis doctoral**

Alba Sánchez Morillo

**Directores**

Dr. Ferran Navarro Risueño

Dra. Paula Espinal Marín

Departamento de Genética y Microbiología,

Facultad de Biociencias

Barcelona, Octubre 2020







**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Patogénesis de *Staphylococcus epidermidis* en la  
infección de prótesis articular**

Tesis doctoral presentada por **Alba Sánchez Morillo** para optar al grado de doctor en Ciencias en el programa de Doctorado de Microbiología del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biociencias de la Universidad Autònoma de Barcelona bajo la direcció del **Dr. Ferran Navarro Risueño** y la **Dra. Paula Espinal Marín** y la tutoría del **Dr. Ferran Navarro Risueño**.

**Barcelona, 2020**



El **Dr. Ferran Navarro Risueño**, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y profesor asociado del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona como director y tutor de la tesis y la **Dra. Paula Espinal Marín**, investigadora postdoctoral del Departamento de Microbiología en Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) de Barcelona como directora de la tesis.

Certifican que:

La memoria titulada “Patogénesis de *Staphylococcus epidermidis* en la infección de prótesis articular”, presentada por **Alba Sánchez Morillo** para obtener el grado de doctor en Microbiología, se ha realizado bajo sus direcciones y tutoría.

Para que así conste, y para los efectos oportunos firman el presente documento en Barcelona,



Dr. Ferran Navarro Risueño  
**Director y tutor**



Dra. Paula Espinal Marín  
**Directora**



Alba Sánchez Morillo  
**Doctoranda**



*A las personas que han estado a mi lado*



*Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas.*

*Marie Curie.*





# Agradecimientos





Casi 4 años después de empezar como una estudiante de Máster en Sant Pau, salgo con una tesis doctoral que no hubiese sido posible sin la implicación de muchas personas. Por eso, quisiera agradecer a:

Mis directores de tesis, el Dr. Ferran Navarro y la Dra. Paula Espinal, por su apoyo incondicional, por su paciencia y confianza depositada en mi para hacer esto posible, y por todo lo que he llegado a aprender gracias a ellos. Han sido tantas correcciones, tantos consejos, tanta ayuda... que ha quedado reflejado en los logros que hemos conseguido. Quería agradecerles, en especial, que me empujaran a hacer cosas que me han ayudado a superar nuevos retos. Gracias de corazón, ha sido una experiencia muy gratificante para mi.

A los facultativos adjuntos del Servicio de Microbiología (Carmen Muñon, Ferran Sánchez, Alba Rivera, Nuria Rabella y Nuria Margall) por su ayuda, opiniones y correcciones en las sesiones de investigación y en la preparación de exposiciones.

Al antiguo jefe del Servicio de Microbiología, el Dr. Pere Coll, del cual he podido aprender y mejorar gracias a su gran conocimiento.

A la Dra. Natividad de Benito, por darme la oportunidad de conocer el mundo de las prótesis, por permitirme ser parte del proyecto, por

su tiempo dedicado a explicarme todo lo que no entendía, y por haber podido crear este trabajo que combina conocimientos microbiológicos y clínicos.

Al laboratorio de rutina de Microbiología del Hospital Sant Pau, por acogerme tan bien ya que he pasado gran parte de mi recorrido “abajo” y me llevo muy buen recuerdo de todos.

A Alba Rivera, por todo lo que me ha enseñado sobre antibióticos, por todas las técnicas aprendidas (a destacar la capacidad bactericida), por todas las charlas y consejos, y por haber compartido tantísimos momentos, sobretodo buenos, porque siempre tenía algo que decir o cantar que alegrase el laboratorio.

A Raul Altaba y Daniela Miniac, por dejarme ser una más en el laboratorio de Antis y porque siempre me han ayudado cuando lo necesitaba, a pesar de que tuviesen trabajo.

A Pere Berenguer, Cristina Gutiérrez y Yésica González, por la recolección de muestras y la conservación de la colección de cepas utilizadas en el estudio.

A Montse Esteban y Rosa Peguero, por todo el material que han preparado para el estudio con mucho cariño.

A Elena García y Rosa Labeaga, por prestarme la pipeta multicanal tantas veces que ni las se contar, y siempre con esa simpatía.

A mis compañeros del IR (también conocido como antiguo Pabellón 17 en ruinas) con los que he compartido momentos inolvidables. Son los que han vivido de más cerca esta experiencia, mi principio y final, mis buenos y malos momentos. Siempre han estado para ofrecerme su ayuda de manera desinteresada y les estaré eternamente agradecida.

Gracias a Paula Espinal (directora), que ha sido mi mami de Barcelona. Con eso quiero englobar las infinitas cosas que me ha enseñado que han hecho que mejorase aspectos tanto laborales como personales. Y aún con distancia de por medio, siempre consigue estar cerca.

Gracias a Montse Español, por ser de las personas con más predisposición a ayudar que conozco, por sacar tiempo aunque no lo tenga, por cuidarnos a todos en general y preocuparse tanto (y no dejar que pasemos hambre nunca).

Gracias a Laura Gómez o Lauri para los amigos, por todo lo que me ha ayudado, por su apoyo y cariño diario, por esa forma de enseñar tan divertida, y, sobretodo, por alegrarnos los días con esa energía que tiene.

Gracias a Elisenda Miró, por sus aportaciones y soporte en mi trabajo, por hacer que aprendamos un poco más de la WGS, y por las colonias tan divertidas en la ECCMID de Madrid.

Gracias a Marc Rubio, por ser un gran apoyo laboral y personal, sobretodo en estos últimos meses, por la admirable aportación a mi trabajo, por enseñarme un idioma parecido al chino (bioinformática), y por escuchar y aconsejar siempre.

Gracias a Judith Rodríguez, por entendernos tanto, por todas las charlas intensas que hemos tenido, por enseñarme truquitos en las técnicas, por ser mi compi de poyata y de despacho, por todas las risas y por ser una amiga.

Gracias a Adrià Cruells, por incorporarse tan rápido al grupo y estar dispuesto a ayudar desde el principio.

Y gracias a los compis que ya no están en el laboratorio, pero que han aportado su granito de arena. Gracias a Yaidelys Iglesias y Ana Fernández, por todos los momentos, se les echa de menos. Y en especial, gracias a Lucas García, el cual me ayudó en una parte de mi proyecto y pude tener la oportunidad de enseñar lo que yo aprendí.

Por último, agradezco a los que siempre están a mi lado, da igual donde esté el camino. A mi gran familia, que siempre me apoya y me anima en todo lo que haga. A mis amigas, que siguen estando en todos mis logros para celebrarlo conmigo y en mis malos momentos para ayudarme. A mi amiga Cris, por el bonito diseño de la portada. A los que fueron mis compis de piso, que siguen desde el principio mi trabajo y compartieron conmigo la inolvidable etapa en Barcelona. A Iván, que me ha dado la fuerza que necesitaba, sobretodo en esta última y más difícil etapa, y por todo lo que ha hecho por mi. Y a mis padres, que han hecho todo lo posible para que llegase hasta aquí y les debo todo lo que tengo, porque es gracias a ellos.





# Índice





ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XVIII
RESUMEN.....	XXI
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. DEFINICIÓN DE LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR.....	8
1.1.2. FACTORES DE RIESGO DE LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR.....	10
1.1.3. CLASIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR.....	11
1.1.4. ETIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR .....	12
1.2. ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS (CONS).....	17
<b>1.3. STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS.....</b>	<b>20</b>
1.3.1. PATOGENICIDAD .....	23
1.3.2. FORMACIÓN DEL <i>BIOFILM</i> .....	25
1.3.2.2. Fase de acumulación.....	34
1.3.2.3. Fase de maduración.....	37
1.3.2.4. Fase de desprendimiento.....	37
1.3.3. Regulación del biofilm .....	38
1.3.3.1. Sistema Quorum Sensing.....	38
1.3.3.2. Modulinas solubles en fenol (PSMs).....	39
1.3.4. OTROS SISTEMAS DE REGULACIÓN.....	41
1.3.4.1. Elementos genéticos móviles.....	41
1.3.5. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>S. EPIDERMIDIS</i> .....	43
1.3.5.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) .....	43
1.3.5.2. Tipificación multilocus de secuencias (MLST).....	44
1.3.5.3. Secuenciación del genoma completo (WGS).....	47
1.3.6. Resistencia a antibióticos .....	51
1.3.6.1. Cassette cromosómico estafilocócico mec (SCCmec).....	55
<b>1.4. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES PROTÉSICAS .....</b>	<b>67</b>
1.4.1. RIFAMPICINA.....	71
1.4.2. FLUOROQUINOLONAS.....	71
1.4.3. VANCOMICINA .....	72
1.4.4. DAPTOMICINA .....	72
<b>1.5. PROFILAXIS EN INFECCIONES PROTÉSICAS.....</b>	<b>72</b>
<b>2. INTERÉS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>76</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>81</b>
<b>3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>83</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>86</b>

4.1.	CEPAS DEL ESTUDIO .....	88
4.2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN .....	92
4.3.	ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA .....	97
4.3.1.	TÉCNICA DE DISCO DIFUSIÓN .....	97
4.3.2.	TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN .....	101
4.4.	EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO .....	104
4.5.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	109
4.6.	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	114
4.7.	PURIFICACIÓN .....	116
4.8.	SECUENCIACIÓN SANGER.....	116
4.9.	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS .....	119
4.10.	ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR POR MACRORESTRICCIÓN GENÓMICA Y ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE) .....	119
4.11.	MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) .....	126
4.12.	SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (WGS) .....	132
4.12.1.	EXTRACCIÓN DE ADN .....	133
4.12.2.	CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL ADN .....	136
4.12.3.	PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS .....	137
4.12.4.	SECUENCIACIÓN .....	138
4.12.5.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	141
4.13.	DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA .....	146
4.13.1.	TIPIFICACIÓN CASSETTE <i>SCCMEC</i> .....	149
4.14.	FORMACIÓN FENOTÍPICA DEL <i>BIOFILM</i> .....	149
4.15.	DETECCIÓN DE DETERMINANTES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> Y OTROS ELEMENTOS .....	153
4.15.1.	TIPIFICACIÓN <i>AGR</i> Y <i>ACME</i> .....	155
4.16.	ANÁLISIS DE DATOS .....	156
4.17.	ASPECTOS ÉTICOS .....	157
5.	RESULTADOS .....	159
5.1.	CEPAS DEL ESTUDIO .....	161
5.2.	ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA .....	164
5.3.	DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	168
5.3.1.	<i>Por PCR</i> .....	168
5.3.2.	<i>Por WGS</i> .....	172

5.4.	TIPIFICACIÓN DEL CASSETTE <i>SCCMEC</i> .....	174
5.4.1.	<i>Por PCR</i> .....	174
5.4.2.	<i>Por WGS</i> .....	176
5.5.	ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR POR MACRORESTRICCIÓN GENÓMICA Y ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE) .....	178
5.6.	MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) .....	182
5.7.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS CON ST2.....	191
5.7.1.	<i>Análisis para definir posibles transmisiones</i> .....	199
5.7.2.	<i>Comparación entre PFGE y WGS</i> .....	212
5.7.3.	<i>Estudio de asociación del genoma completo (GWAS)</i> .....	212
5.8.	FORMACIÓN FENOTÍPICA DEL BIOFILM.....	217
5.9.	DETECCIÓN DE DETERMINANTES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> Y ELEMENTOS MÓVILES .....	220
5.9.1.	<i>Por PCR</i> .....	220
5.9.2.	<i>Por WGS</i> .....	225
5.10.	RELACIÓN DE SECUENCIOTIPOS (STs) Y DETERMINANTES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> Y ELEMENTOS MÓVILES .....	228
5.11.	RELACIÓN ENTRE LOS DETERMINANTES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> Y LA FORMACIÓN FENOTÍPICA DE <i>BIOFILM</i> .....	230
5.12.	RELACIÓN DE LOS DETERMINANTES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> Y LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS .....	232
5.13.	RELACIÓN DE SECUENCIOTIPOS (STs) Y LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS... ..	234
5.14.	PUBLICACIÓN .....	235
6.	DISCUSIÓN .....	238
7.	CONCLUSIONES .....	276
8.	REFERENCIAS .....	281
9.	ANEXOS .....	312



# Índice de Tablas

- Tabla 1:** Definición de la infección de prótesis articular.
- Tabla 2:** Clasificación y presentación clínica de las infecciones de prótesis articular.
- Tabla 3:** Etiología de las IPAs. Datos del 2018 del Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña (VINCat).
- Tabla 4:** Etiología de las IPAs en prótesis de rodilla y cadera.
- Tabla 5:** Factores implicados en la formación del *biofilm*.
- Tabla 6:** Clasificación de secuenciotipos (STs) en complejos clonales (CCs).
- Tabla 7:** Lista de los términos más utilizados relacionados con *Whole Genome Sequencing*.
- Tabla 8:** Secuenciación del genoma completo de *S. epidermidis*.
- Tabla 9:** Tasas de resistencia antimicrobiana de CoNS, *S. epidermidis* y *S. aureus* en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en el año 2019.
- Tabla 10:** Comparación de tasas de resistencia de antibióticos de *S. epidermidis* en diferentes estudios.
- Tabla 11:** Complejo *mec* ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).
- Tabla 12:** Complejo *ccr* ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).

- Tabla 13:** Tipos de SCCmec ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).
- Tabla 14:** Genes de resistencia a antibióticos más comunes en *S. epidermidis*.
- Tabla 15:** Tratamiento de la IPA en estafilococos.
- Tabla 16:** Siglas y posición de los antibióticos evaluados mediante disco difusión.
- Tabla 17:** Puntos de corte de los antibióticos evaluados en *S. epidermidis*.
- Tabla 18:** Contenido de la mezcla de reacción de la PCR.
- Tabla 19:** Genes y condiciones para MLST de *S. epidermidis*.
- Tabla 20:** Especificaciones de la calidad del ADN por Novogene (<https://en.novogene.com>).
- Tabla 21:** Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas en el estudio de los genes de resistencia.
- Tabla 22:** Categorías de formación de biofilm.
- Tabla 23:** Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas en el estudio de los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles.
- Tabla 24:** Tipificación del elemento móvil ACME en *S. epidermidis*.
- Tabla 25:** Origen de las cepas de *S. epidermidis* incluidas en el estudio.
- Tabla 26:** Tasas de resistencia a antibióticos en cepas de *S. epidermidis*.



- Tabla 27:** Genes de resistencia en cepas de *S. epidermidis*.
- Tabla 28:** Detección de genes de resistencia por PCR y WGS.
- Tabla 29:** Tipificación del cassette SCCmec en este estudio.
- Tabla 30:** Comparación de las técnicas PCR y WGS en la tipificación del cassette SCCmec en las cepas ST2.
- Tabla 31:** Secuenciotipos y alelos nuevos descritos en este estudio.
- Tabla 32:** Agrupaciones de los secuenciotipos del estudio mediante eBURST.
- Tabla 33:** Clasificación de los secuenciotipos en el complejo clonal 2 (CC2), según la población de cepas de *S. epidermidis*.
- Tabla 34:** Análisis de SNPs: *Clusters* generados según la diferencia de SNPs en *S. epidermidis*.
- Tabla 35:** Cepas de *S. epidermidis* ST2 en *clusters* con un umbral de  $\leq 15$  SNPs.
- Tabla 36:** Diferencia de SNPs entre las cepas del *cluster* 1.
- Tabla 37:** Genes con *k*-mers significativos en las cepas ST2.
- Tabla 38:** Prevalencia de la formación de *biofilm* en cepas *S. epidermidis*.
- Tabla 39:** Prevalencia de los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles en cepas de *S. epidermidis*.
- Tabla 40:** Detección de genes relacionados con la formación de *biofilm* por PCR y WGS.

- Tabla 41:** Relación entre los secuenciotipos y los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles.
- Tabla 42:** Presencia de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* en la formación de *biofilm* fuerte.
- Tabla 43:** Resistencia antibiótica según la presencia de la secuencia de inserción *IS256* y el gen *icaA*.
- Tabla 44:** Resistencia antibiótica según el secuenciotipo.



# Índice de Figuras

- Figura 1:** Representación de una prótesis articular.
- Figura 2:** Tasas de incidencia de IPA de cadera y rodilla en Cataluña en el periodo 2011-2018 según el Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña (VINCat).
- Figura 3:** Diferenciación de los estafilococos en medio Chapman.
- Figura 4:** Evolución de la nomenclatura de *S. epidermidis*.
- Figura 5:** Esquema de la formación del *biofilm*.
- Figura 6:** Esquema de los mecanismos de patogenicidad de *S. epidermidis*.
- Figura 7:** Proteínas Ses en *S. epidermidis*.
- Figura 8:** Aplicación del algoritmo eBURST en datos de MLST.
- Figura 9:** Representación circular del cromosoma de la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis*.
- Figura 10:** Estructura del cassette *SCCmec* tipo I (1B).
- Figura 11:** Medidas preventivas para las infecciones de prótesis articular.
- Figura 12:** Esquema de la metodología realizada en este estudio.

- Figura 13:** Esquema de la metodología realizada en las cepas ST2.
- Figura 14:** Esquema de la técnica de MALDI-TOF.
- Figura 15:** Panel de antibiograma para estafilococos en la técnica disco difusión según el laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
- Figura 16:** Esquema de la metodología de extracción de ADN.
- Figura 17:** Placa Epoch (Biotek).
- Figura 18:** Espectrofotómetro Epoch (BioTek).
- Figura 19:** Cuantificación de ácidos nucleicos en el software *Gen5* (Biotek).
- Figura 20:** Componentes principales de la PCR.
- Figura 21:** Etapas de la PCR.
- Figura 22:** Esquema de la secuenciación Sanger.
- Figura 23:** Elementos para la realización de PFGE.
- Figura 24:** Gel de agarosa de PFGE en CHEF-DR III (Bio-Rad).
- Figura 25:** Imagen de los patrones de bandas en el gel de agarosa de PFGE.
- Figura 26:** Análisis de los patrones de bandas de PFGE.
- Figura 27:** Esquema del análisis de las secuencias de los genes de MLST.
- Figura 28:** Esquema de la técnica de secuenciación masiva.
- Figura 29:** Fluorómetro Qubic (izquierda) y espectrofotómetro Nanodrop (derecha) (ThermoFisher™ Scientific).

- Figura 30:** Esquema resumido de la secuenciación por Illumina.
- Figura 31:** Cuantificación de la formación fenotípica del *biofilm*.
- Figura 32:** Comparación de las tasas de resistencia a antibióticos en las 3 poblaciones de cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 33:** Presencia del fenotipo MRSE en las tres poblaciones de cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 34:** Dendrograma de las cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 35:** Distribución de los secuenciotipos (ST) en las 3 poblaciones de *S. epidermidis*.
- Figura 36:** Árbol de expansión mínima (*minimum spanning tree*-MST) de todas las cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 37:** Árbol filogenético circular (número 1) de *S. epidermidis*.
- Figura 38:** Árbol filogenético (número 2) de *S. epidermidis* ST2.
- Figura 39:** Árbol filogenético (número 3) de las cepas *S. epidermidis* ST2 del estudio.
- Figura 40:** Análisis del *core genome* y *accessory genome* de las cepas de *S. epidermidis* ST2.
- Figura 41:** Matriz de SNPs de alineamiento por parejas.
- Figura 42:** Árbol filogenético de 22 cepas de *S. epidermidis* ST2.
- Figura 43:** *k*-mers significativos representados en un gráfico de Manhattan.
- Figura 44:** Ampliación de la región intergénica entre *IS110* y *IS1182*, donde se acumulan *k*-mers significativos.

- Figura 45:** Formación de *biofilm* mediante la tinción con cristal violeta.
- Figura 46:** Porcentaje de formación de *biofilm* en cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 47:** Frecuencia de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles en cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 48:** Tipos de *agr* en cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 49:** Tipos del elemento móvil ACME en cepas de *S. epidermidis*.
- Figura 50:** Publicación derivada del presente trabajo.





# Abreviaturas

<b>ACME</b>	<i>Arginine Catabolic Mobile Element</i>	A	
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico		
<b>AR</b>	Artritis Reumatoide		
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>		B
<b>BURST</b>	<i>Based Upon Related Sequence Types</i>		
<b>CC</b>	Complejo Clonal		C
<b>CFU</b>	Unidades Formadoras de Colonias		
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino		
<b>CLI</b>	Clindamicina		
<b>CLSI</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>		
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria		
<b>CoNS</b>	Estafilococos Coagulasa Negativos	D	
<b>CoPS</b>	Estafilococos Coagulasa Positivos		
<b>COT</b>	Cotrimoxazol		
<b>CT</b>	Caldo Trypticasa		
<b>CQ</b>	Campo Quirúrgico		
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>		E
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Control and Prevention</i>		
<b>EPS</b>	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>		
<b>ERY</b>	Eritromicina		
<b>EUCAST</b>	<i>European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>		F
<b>FOS</b>	Fosfomicina		
<b>FUS</b>	Ácido Fusídico	G	
<b>GEN</b>	Gentamicina		
<b>GWAS</b>	<i>Genome-Wide Association Study</i>	I	
<b>IPA</b>	Infección de Prótesis Articular		
<b>LIN</b>	Linezolid	L	
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>		
<b>MDR</b>	Multirresistencia	M	
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>		

<b>MRSA</b>	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>	
<b>MRSE</b>	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis</i>	
<b>MSCRAMM</b>	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>	
<b>MSIS</b>	<i>Musculoskeletal Infection Society</i>	
<b>MSSA</b>	<i>Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus</i>	
<b>MSSE</b>	<i>Methicillin-Susceptible Staphylococcus epidermidis</i>	
<b>MST</b>	<i>Minimum Spanning Tree</i>	
<b>MUP</b>	Mupirocina	
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	
<b>OA</b>	Osteoartritis	O
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>	
<b>OXA</b>	Oxacilina	
<b>PBP</b>	<i>Penicillin binding proteins</i>	P
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	
<b>PEN</b>	Penicilina	
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>	
<b>PIA</b>	Adhesina Intercelular Polisacárida	
<b>PNAG</b>	Poli-N-acetilglucosamina	
<b>PS</b>	Personas Sanas	
<b>PSMs</b>	<i>Phenol-Soluble Modulins</i>	
<b>QS</b>	<i>Quorum Sensing</i>	Q
<b>RIF</b>	Rifampicina	R
<b>SCCmec</b>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>	S
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	
<b>SNV</b>	<i>Single Nucleotide Variant</i>	
<b>ST</b>	Secuenciotipo	
<b>SXT</b>	Trimetoprim-Sulfametoxazol	T
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA	
<b>TCO</b>	Teicoplanina	
<b>TET</b>	Tetraciclina	
<b>VAN</b>	Vancomicina	V
<b>VINCat</b>	Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña	
<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i>	W



# Resumen





Las infecciones de prótesis articular son complicaciones serias difíciles de tratar, que pueden generar secuelas físicas irreversibles y grandes costos económicos. Están causadas mayoritariamente por estafilococos coagulasa negativos, siendo *Staphylococcus epidermidis* el agente etiológico más común. *S. epidermidis* es un comensal importante en la piel humana que ha tenido un gran impacto como patógeno oportunista en las infecciones relacionadas con cuerpos extraños. La producción de *biofilm* en la superficie de los materiales implantados se ha considerado uno de los principales factores de virulencia de *S. epidermidis*. Durante la formación de *biofilm*, están implicados una serie de genes que regulan las diferentes fases: adhesión, acumulación, maduración y desprendimiento. Algunos de estos genes han sido descritos como marcadores moleculares que diferencian cepas causantes de IPA de *S. epidermidis* de las cepas comensales. Hasta la fecha, no se ha identificado un marcador único para distinguir las cepas causantes de IPA de las cepas comensales en poblaciones de *S. epidermidis*.

En este estudio, se pretende identificar marcadores genéticos relacionados con la patogenicidad de *S. epidermidis* que permitan discriminar las poblaciones de cepas causantes de IPA y comensales. Para llegar a este objetivo, hemos estudiado 117 cepas de tres poblaciones de *S. epidermidis*: 50 cepas de pacientes con infección de prótesis articular (IPA), 50 cepas de la piel y fosas nasales de personas sanas (PS), y 17 cepas del campo quirúrgico durante una

artroplastia primaria (CQ). Los principales objetivos fueron determinar la sensibilidad a antibióticos mediante microdilución y detectar los mecanismos de resistencia mediante PCR y secuenciación, determinar la estructura poblacional mediante campo pulsado (PFGE) y *multilocus sequence typing* (MLST), determinar la formación de *biofilm* mediante la tinción con cristal violeta y detectar los genes implicados u otros elementos por PCR y secuenciación. Adicionalmente, se estudiaron en profundidad las cepas ST2 mediante secuenciación masiva (WGS).

El estudio de sensibilidad antibiótica determinó altas tasas de resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados: 75,2% a penicilina, 69,2% a eritromicina, 47% a oxacilina, 41,9% a clindamicina, 37,6% a ácido fusídico, 35,9% a gentamicina, 35% a ciprofloxacino y 35% a cotrimoxazol. Todas las cepas permanecieron sensibles a teicoplanina, vancomicina, daptomicina y tigeciclina. Las cepas de IPA fueron las más resistentes, seguidas de las de CQ y, en menor medida, las cepas comensales. El fenotipo de multirresistencia se observó en un 68,4% de las cepas, y un 47% fueron MRSE (resistentes a meticilina/oxacilina).

En la detección de genes de resistencia antimicrobiana, el gen *mecA* y el gen *df<sub>r</sub>S* fueron los mecanismos de resistencia a oxacilina y cotrimoxazol, respectivamente. Los genes *m<sub>ph</sub>C* (90,1%), *m<sub>sr</sub>A* (88,9%) y *ermC* (67,9%) fueron los mecanismos más comunes en la

resistencia a macrólidos, y los genes *ant(4')-IaC* (95,2%) y *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* (83,3%) en la resistencia a aminoglucósidos. Dos cepas resistentes a linezolid tuvieron la mutación G2603T en el 23S rRNA y la mutación Val154Leu en la proteína L3.

La técnica de MLST determinó 54 secuenciotipos (STs) diferentes en las 117 cepas de *S. epidermidis*; se describieron 24 STs y 14 alelos nuevos en este estudio. El ST2 predominó en las cepas de IPA (44%) y fue exclusivo en esta población, seguido del ST640 y el ST5 (12% ambos secuenciotipos). Las cepas PS y CQ presentaron una gran variabilidad de STs, sin ningún ST predominante. La mayoría de cepas (68%) se agruparon en el complejo clonal 2 (CC2).

El análisis clonal de las cepas mediante PFGE determinó seis patrones de PFGE que incluyeron de 2-5 cepas y 52 patrones únicos de PFGE. Se realizó un estudio complementario por WGS para profundizar en las relaciones epidemiológicas a través del enfoque por SNPs y se determinaron dos posibles eventos de transmisión de paciente a paciente. No fue posible confirmar la transmisibilidad dado que no se encontraron relaciones clínico-epidemiológicas.

Todas las cepas fueron productoras de *biofilm*, lo que sugiere que la formación de *biofilm* no es un factor discriminativo de las cepas causantes de IPA y comensales. El contenido de genes relacionados con la formación de *biofilm* varió entre las diferentes poblaciones de



cepas. En las cepas de IPA predominaron los genes *sdrF*, *bhp*, el operón *ica* y la secuencia de inserción *IS256*, y en las cepas comensales los genes *embp* y *hld* y el elemento móvil ACME.

La técnica WGS mostró más sensibilidad y especificidad que el PFGE, en estudios de clonalidad, y que la PCR, en estudios de detección de genes de resistencia, determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y tipificación del cassette *SCCmec*.

En conclusión, a pesar de la dificultad de definir las cepas de *S. epidermidis* que causan la infección, en este estudio se evidenció que las cepas causantes de IPA y comensales no eran iguales. No se encontró un marcador único para diferenciar las cepas de infección y las cepas comensales, pero una combinación de varios marcadores si nos permitió establecer diferencias entre las poblaciones: las cepas de infección protésica pertenecían con mayor frecuencia al clon patogénico ST2 y adquirieron determinantes genéticos que promovieron la infección, como el operón *ica*, *IS256*, *sdrF*, *bhp* y *mecA*. Por el contrario, las cepas comensales se caracterizaron por la presencia significativa de *embp*, *hld* y ACME. Se recomienda la técnica de WGS para estudios de filogenia y detección de genes en *S. epidermidis*.



# 1. Introducción





## 1.1. La infección de prótesis articular

El avance de la ciencia y la medicina está comportando un aumento en la esperanza de vida de la población. Pero a medida que la población envejece, hay más probabilidad de sufrir complicaciones músculo esqueléticas que producen dolor y empeoran la calidad de vida. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), las afecciones músculo-esqueléticas más frecuentes en la población mundial son la osteoartritis (OA) y la artritis reumatoide (AR) <sup>1</sup>. En algunas situaciones, para restablecer el funcionamiento de la articulación, se realiza la substitución de la articulación afectada por una artificial, procedimiento conocido como artroplastia.

Una artroplastia articular mejora la función articular y la movilidad apoyando o reemplazando la función de los órganos que fallan, además de aliviar el dolor y aumentar la calidad de vida de la persona afectada <sup>2,3</sup>. Por eso, las artroplastias de rodilla y cadera son consideradas procedimientos quirúrgicos altamente exitosos, con más del 95% de supervivencia en 10 años de seguimiento (Figura 1) <sup>4</sup>. En la última década, la demanda de las artroplastias de rodilla y cadera han aumentado considerablemente y se prevé que lo continúe haciendo en los próximos años, concretamente seis veces más para el 2030 <sup>4-7</sup>. Con este aumento de las artroplastias, también se aumentan las infecciones postoperatorias que pueden ocurrir

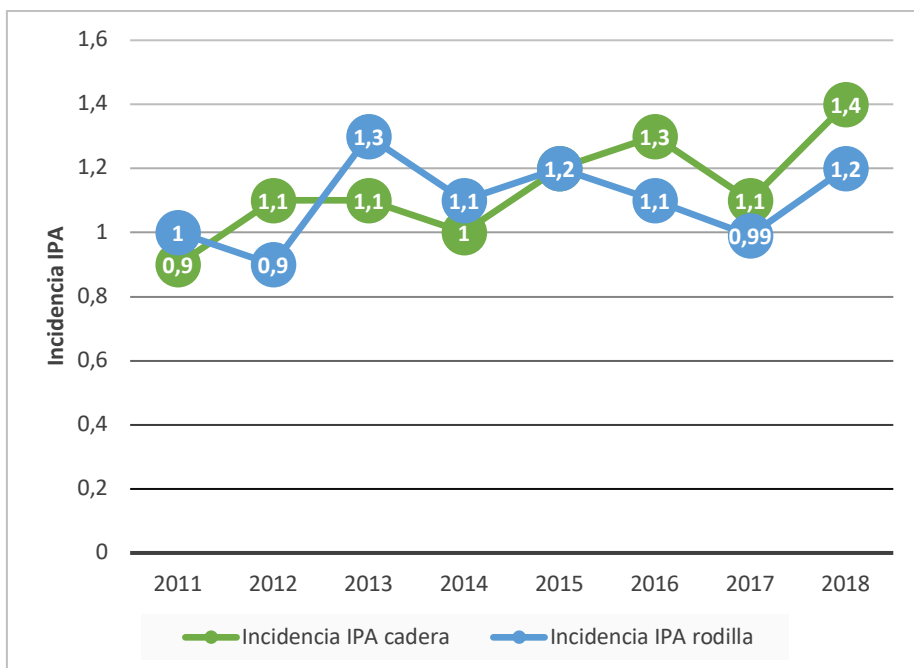
durante la implantación <sup>5</sup>, una de las complicaciones más devastadoras <sup>6,8</sup>.



**Figura 1.** Representación de una prótesis articular. De cadera (izquierda) y de rodilla (derecha) <sup>9</sup>.

La infección de prótesis articular (IPA) se define como la infección de la prótesis y del tejido adyacente producida por parte de uno o varios microorganismos. La incidencia de esta infección en España se sitúa alrededor del 2%, más específicamente entre el 0,5-2,2% aproximadamente de los casos de artroplastias primarias <sup>7,8,10</sup>. En el informe del 2018 del Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña (VINCat), se reportó una incidencia del 1,4% y 1,2% de infecciones en cirugía de cadera y de rodilla, respectivamente <sup>11</sup>. Como podemos observar en la Figura 2, las tasas de incidencia se han mantenido alrededor de esos valores

desde el año 2011. En comparación, según la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid, las tasas de IPA en cadera y rodilla fueron 1,32% y 1,09%, respectivamente, cifras muy similares a las reportadas en Cataluña <sup>12</sup>. A nivel europeo, según el último reporte anual publicado por el Sistema de Vigilancia Europea del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), en 2017, la incidencia fue de un 1% (0,4-2,2%) y un 0,5% (0,2-2,7%) para IPA de cadera y de rodilla, respectivamente (<https://www.ecdc.europa.eu/en>). En Estados Unidos de América, aunque la incidencia de IPA aumentó de 1,99 a 2,18% en cadera y de 2,05 a 2,18% en rodilla del año 2001 al 2009 <sup>13</sup>, actualmente la tasa de infección varía de 0,6% a 2,4% <sup>5</sup>.



**Figura 2.** Tasas de incidencia de IPA de cadera y rodilla en Cataluña en el periodo 2011-2018 [Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña (VINCat)] <sup>11</sup>.

A pesar de que la incidencia no sea considerablemente alta, la aparición de una IPA tiene varias consecuencias desfavorables para el paciente, entre ellas, la necesidad de un tratamiento antibiótico extensivo, estancias prolongadas en el hospital y repetidas operaciones quirúrgicas <sup>5,8</sup>. Todos estos procedimientos comportan altos costes, tanto intrahospitalarios (tratamiento quirúrgico, antibióticos, entre otros), así como extrahospitalarios (visitas ambulatorias, rehabilitación, farmacia, entre otros). Se ha estimado que el costo de la resolución de una IPA en una artroplastia de rodilla o cadera puede ir desde aproximadamente 95.000 a 115.000 € por



paciente <sup>8</sup>, un coste de 3 a 5 veces superior al de la implantación primaria de la prótesis <sup>2,4</sup>. Proyecciones futuras en Estados Unidos de América indicaron que los costos de la infección superarán \$1 billón en 2020 <sup>4</sup>.

### **1.1.1. Definición de la infección de prótesis articular**

Actualmente no existe una definición de la infección de prótesis articular única y validada, ya que ninguna ha demostrado tener una precisión diagnóstica adecuada. Múltiples sociedades médicas han propuesto diferentes definiciones para llegar a un consenso de la definición de IPA. En 2011, la Sociedad de Infección Musculoesquelética, en inglés the *Musculoskeletal Infection Society* (MSIS), propuso por primera vez unos criterios para la definición de IPA que fueron revisados en 2014 y 2018 por la Reunión de Consenso Internacional sobre IPA <sup>10,14,15</sup>. Además, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América, en inglés the *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), publicó otra serie de criterios <sup>16</sup>.

Por lo anterior, según la última revisión por el Consenso Internacional (2018), se define como IPA cuando el paciente cumple con uno o más de los criterios indicados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Definición de la infección de prótesis articular. La infección es diagnosticada cuando se cumple como mínimo uno de los criterios. Adaptación de Izakovicova *et al.* <sup>15</sup>.

Prueba	Criterios	Sensibilidad	Especificidad
<b>Características clínicas</b>	Presencia de una fístula (tracto sinusal) que comunica con la prótesis articular o purulencia alrededor de la prótesis	20-30%	100%
<b>Conteo de leucocitos en el líquido sinovial</b>	> 2000/ $\mu$ l leucocitos o 70% granulocitos/ neutrófilos polimorfonucleares (PMN)	$\approx$ 90%	$\approx$ 95%
<b>Análisis histológico del tejido periprotésico</b>	Inflamación ( $\geq$ 23 granulocitos por 10 campos de alta potencia)	73%	95%
<b>Microbiología</b>	Crecimiento microbiano en:		
	• Líquido sinovial o	45-75%	95%
	• $\geq$ 2 muestras de tejido positivas o	60-80%	92%
	• Líquido de sonicación (> 50 CFU/ml)	80-90%	95%

Gracias a los criterios propuestos, se ha demostrado una mayor sensibilidad en el diagnóstico de IPA <sup>15</sup>. Para poder aplicar estos

criterios, deben tomarse al menos de 3 a 5 muestras de material periprotésico y, si es posible, líquido sinovial, y cultivarse e incubarse en entornos aeróbicos y anaeróbicos. Puede darse el caso que se produzca una infección sin cumplir estos criterios, especialmente por especies menos virulentas como *Cutibacterium acnes* <sup>4</sup>.

### **1.1.2. Factores de riesgo de la infección de prótesis articular**

La identificación de factores de riesgo puede ayudar al desarrollo de estrategias preventivas de una IPA. Se han asociado múltiples factores de riesgo al desarrollo de una IPA que pueden estar relacionados con el paciente, con la intervención quirúrgica o con el postoperatorio.

El género masculino, la edad temprana, el alto índice de masa corporal (IMC), la diabetes mellitus, la obesidad mórbida, la artritis reumatoide, la desnutrición, el consumo de tabaco, el alcohol, las drogas, la inmunosupresión y la terapia con esteroides, son factores específicos del paciente que aumentan el riesgo de IPA en una artroplastia <sup>7,8,13</sup>. Una mayor duración de la cirugía, un hematoma o una infección superficial del sitio quirúrgico, son algunos de los factores de riesgo relacionados con la intervención quirúrgica y el postoperatorio <sup>7,13</sup>.

### 1.1.3. Clasificación de la infección de prótesis articular

Las infecciones de prótesis articular pueden clasificarse en función del momento de la aparición de la clínica en precoz/temprana, retardada y tardía (Tabla 2). Si aparece entre los primeros tres meses después de la cirugía, hablaríamos de una infección temprana. Las infecciones tempranas suelen atribuirse a la flora endógena de la piel del paciente, del personal médico o incluso al campo quirúrgico <sup>4</sup>. Si la infección se da entre los 3 y 12-24 meses después del acto quirúrgico, se denominaría infección retardada. Al igual que la infección precoz, la infección retardada suele relacionarse también con la contaminación directa en el momento de la cirugía, con la diferencia de que la precoz está causada por microorganismos más virulentos, como *Staphylococcus aureus*, estreptococos o enterococos, y la retardada por especies menos virulentas, como *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes* o enterococos <sup>2,4,8,13,15</sup>. Por último, la infección tardía aparece a partir de los 12-24 meses de la cirugía, y se produce frecuentemente por una diseminación por vía hematógena de otra infección. Aunque, al igual que los otros tipos, también puede ser causada por una contaminación directa en la cirugía por un microorganismo poco virulento <sup>2,8,13</sup>.

**Tabla 2.** Clasificación y presentación clínica de las infecciones de prótesis articular.

Adaptación de Gomez-Urena *et al.* <sup>2</sup>.

Tipo de infección	Aparición clínica	Mecanismo de infección	Organismos	Presentación
<b>Precoz</b>	< 3 meses	Contaminación intraoperatoria	Bacterias virulentas ( <i>S. aureus</i> , estreptococos, enterococos)	Eritema, edema, calor y sensibilidad
<b>Retardada</b>	3 a 12-24 meses	Contaminación intraoperatoria	Bacterias menos virulentas ( <i>S. epidermidis</i> , <i>C. acnes</i> , enterococos)	Dolor y rigidez en las articulaciones
<b>Tardía</b>	> 12-24 meses	Vía hematológica	Bacterias virulentas ( <i>S. aureus</i> )	Eritema, edema, calor y sensibilidad
		Contaminación intraoperatoria	Bacterias menos virulentas ( <i>C. acnes</i> )	Dolor articular, tracto sinusal

#### 1.1.4. Etiología de la infección de prótesis articular

Un diagnóstico preciso que identifique el microorganismo causante de la IPA es importante para poder elegir un tratamiento antimicrobiano apropiado que erradique la infección. Los microorganismos más comunes responsables de una IPA de rodilla y cadera son los cocos grampositivos, concretamente *S. aureus* y los

estafilocococs coagulasa negativos (CoNS), predominando *S. epidermidis* dentro de este grupo <sup>4,5,8,13</sup>. En menor medida que los cocos grampositivos, las IPA son causadas por bacilos gramnegativos (< 10%), y raramente por hongos (< 1%) <sup>13,17</sup>. En un estudio multicéntrico de Benito et al. en el cual participaron 19 hospitales españoles durante el periodo 2003-2012, los CoNS estuvieron presentes en un 39,6% de los casos de IPA (*S. epidermidis* 23,3%), seguido de *S. aureus* con un 28,1%. Los microorganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *C. acnes* participaron en más del 80% de los casos de IPA, en orden decreciente <sup>18</sup>. En Cataluña, en 2018, según el Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña, el 20,9% y el 19,4% de las IPA fueron causadas por *S. aureus* y CoNS, respectivamente (13,2% por *S. epidermidis*), seguido del 10,9% por *P. aeruginosa* (Tabla 3) <sup>11</sup>.

**Tabla 3.** Etiología de las IPAs. Datos del Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña, 2018 (VINCat) <sup>11</sup>.

Microorganismos	% IPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,9
CoNS	6,2
CoPS	5,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,4
<i>Escherichia coli</i>	4,7
<i>Proteus mirabilis</i>	3,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,3
<i>Propionibacterium spp.</i>	1,6
<i>Corynebacterium spp.</i>	1,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,6
<i>Serratia marcescens</i>	1,6
<i>Enterococcus faecium</i>	1,6
Cultivos negativos	4,7
Otros	13,6

CoNS: estafilococos coagulasa negativos; CoPS: estafilococos coagulasa positivos.

La etiología de las infecciones protésicas no siempre es la misma en todos los hospitales, ya que puede variar entre diferentes localizaciones geográficas. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América los microorganismos más comunes en IPA son *S. aureus*

(38%) y *S. epidermidis* (19%). En cambio, Europa muestra su tasa más alta en estafilococos coagulasa negativos (39%), seguidos de *S. aureus* (13%), estreptococos (6,5%) y enterococos (7%)<sup>4</sup>. En México, los microorganismos más frecuentes en IPA fueron *S. epidermidis* (31%) y *Enterococcus spp.* (18%), ambos superando a *S. aureus* (13%)<sup>17</sup>. Estas diferencias pueden darse según las pautas de profilaxis y tratamiento utilizados en cada hospital.

Otro factor que puede variar la etiología de las IPAs es el lugar donde está colocada la prótesis. En la Tabla 4, se muestra un estudio de Estados Unidos de América que recoge los microorganismos encontrados en IPAs diferenciando que fuesen prótesis de rodilla o cadera: *S. aureus* fue más encontrado en IPA de rodilla y los CoNS en IPA de cadera.

**Tabla 4.** Etiología de las IPAs en prótesis de rodilla y cadera. Datos de Tande *et al.*

13.

Microorganismos	IPA cadera (%)	IPA rodilla (%)
<b><i>S. aureus</i></b>	13	23
<b>CoNS</b>	30	23
<b>Estreptococos</b>	6	6
<b>Enterococos</b>	2	2
<b>Bacilos gramnegativos</b>	7	5
<b>Anaerobios</b>	9	5

IPA: infección de prótesis articular. CoNS: estafilococos coagulasa negativos.

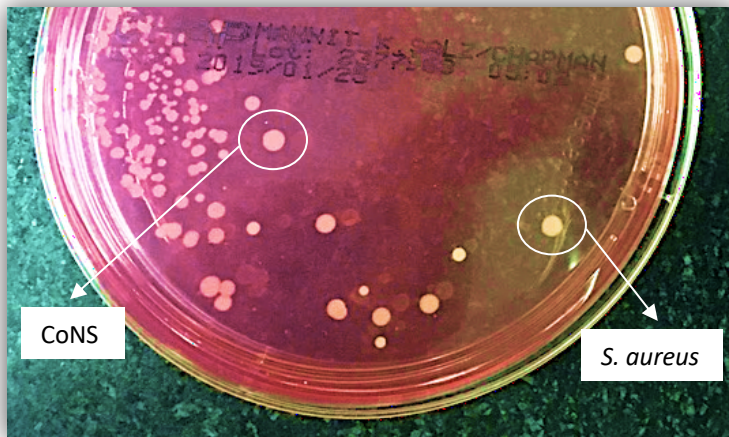


Como hemos visto, los microorganismos causales de IPA son mayoritariamente comensales de la piel humana. Mediante el análisis del gen ribosomal 16S (16S rRNA), se ha estudiado la gran diversidad de bacterias en la piel humana, incluidas las especies *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Micrococcus* y *Corynebacterium*<sup>19,20</sup>. Para que nos hagamos una idea, en una sola palma de la mano pueden coexistir unas 158 especies bacterianas. Pero, a pesar de esta variedad, se observa una composición microbiana similar en hábitats de la piel con características parecidas. Por ejemplo, las especies *Cutibacterium* y *Staphylococcus* predominan en áreas sebáceas, como la frente, mientras que en áreas húmedas, como las axilas, las especies *Staphylococcus* y *Corynebacterium* son las más encontradas<sup>20,21</sup>. Además de tener una composición microbiana característica, cada hábitat tiene una variación temporal de las especies. Si hablamos de un sitio de la piel más cubierto o con presencia de pliegues, las comunidades bacterianas serán más estables a lo largo del tiempo, y si se trata de un lugar de la piel más seco y expuesto, la diversidad en el tiempo será mayor<sup>21</sup>.

Generalmente, los CoNS son los comensales de la piel humana más abundantes, destacando *S. epidermidis* por ser una de las especies aisladas más frecuentemente en el epitelio humano<sup>3,19,22-24</sup>.

## 1.2. Estafilococos coagulasa negativos (CoNS)

Los estafilococos son cocos grampositivos que se caracterizan por agruparse en forma de racimo de uvas. Generalmente, son catalasa positivos y anaerobios facultativos, con excepción de algunas especies. A día de hoy, están descritas 58 especies y 30 subespecies dentro del género *Staphylococcus* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>) (orden: Bacillales; clase: Bacilli; filo: Firmicutes; dominio: Bacteria) <sup>25</sup>. Son los colonizadores más comunes de la piel y las membranas mucosas de los humanos y otros mamíferos. Dentro de los estafilococos, el grupo de CoNS se diferencia de *S. aureus* y otros coagulasa positivos por la carencia de la enzima coagulasa, una enzima que causa la coagulación del plasma sanguíneo <sup>24</sup>. Además, los *S. aureus* fermentan el manitol (aunque otros pocos estafilococos coagulasa negativos, también). Esta característica permite diferenciarlos en medios de cultivo como el medio de Chapman o agar manitol salado. Como podemos observar en la Figura 3, las colonias amarillentas son probablemente de *S. aureus*, ya que han sido capaces de fermentar el manitol del medio de cultivo, a diferencia de las colonias rosáceas, que serían los CoNS.



**Figura 3.** Diferenciación de los estafilococos en medio Chapman. Manitol positivos (colonias amarillas, probablemente *S. aureus*) y manitol negativos (colonias rosáceas, probablemente CoNS).

Anteriormente, los CoNS se diferenciaban de *S. aureus* por ser menos patógenos. Pero en la actualidad, los CoNS han tenido un creciente impacto médico ya que son unos de los principales patógenos nosocomiales, siendo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*, los más destacados<sup>23,26,27</sup>. El hecho de que más de 40 especies de CoNS formen parte de la flora normal de la piel y membranas mucosas del ser humano, facilita las contaminaciones y las infecciones endógenas<sup>26-28</sup>. Análisis metagenómicos han revelado que los CoNS prefieren áreas de mayor humedad, incluyendo las axilas, la región inguinal, la región glútea, el ombligo, las fosas antecubital y poplítea, la planta del pie, las fosas nasales anteriores, la superficie ocular (conjuntiva), entre otros, aunque también se encuentren en abundancia en otros lugares<sup>23</sup>. Un

estudio acerca de los microorganismos en la fosa nasal humana, reportó que *S. epidermidis* colonizó el 97% de todos los individuos, seguido de *S. haemolyticus* (44%), *S. hominis* y *S. capitis* (41% ambos), *S. warneri* (32%) y *S. lugdunensis* (26%)<sup>29</sup>. Estos resultados son una evidencia de que los CoNS con más prevalencia clínica son los principales colonizadores del microbioma de la piel humana<sup>28</sup>. Generalmente, las especies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, y *S. capitis* están asociadas al ser humano, mientras que *S. lentus*, *S. caprae*, y *S. carnosus* se encuentran mayormente en animales<sup>26</sup>.

Las infecciones causadas por CoNS normalmente están asociadas con dispositivos médicos implantados, afectando especialmente a pacientes muy jóvenes, ancianos e inmunocomprometidos. Esto se debe a la presencia abundante de CoNS en la piel, la alta frecuencia de implantación de cuerpos extraños en estos pacientes y del aumento de las tasas de resistencia a antibióticos<sup>23</sup>. Los dispositivos médicos más comúnmente asociados a la infección son las prótesis articulares, los catéteres venosos centrales, las derivaciones de líquido cefalorraquídeo, las válvulas cardíacas protésicas, los dispositivos intracardiacos y los injertos vasculares. En la implantación de estos dispositivos es cuando tiene lugar la inoculación de las bacterias de la piel que dan lugar a la infección<sup>24,26,27,30</sup>. Los CoNS pueden formar unas biopelículas que les permiten adherirse a la superficie inerte de los dispositivos,

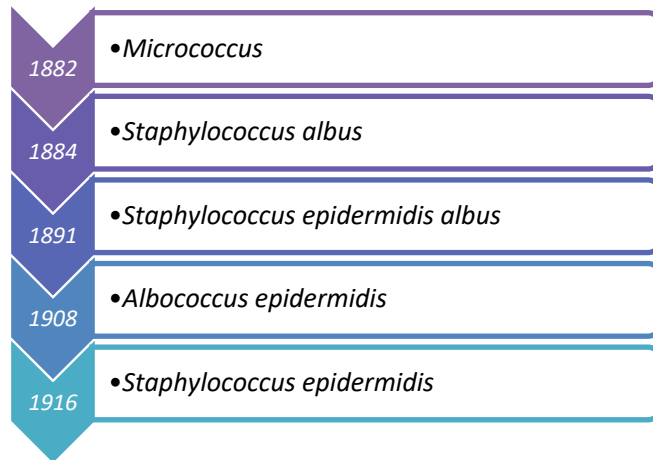
adquiriendo así una mayor protección y resistencia a los antimicrobianos <sup>26</sup> (Ver apartado “Biofilm” más adelante). A pesar de la gran relevancia que están teniendo los CoNS como verdaderos patógenos, en muchos casos pueden actuar como contaminantes que llegan a la muestra durante su recogida o posterior transporte y manipulación <sup>26</sup>. En el estudio de Drago L et al., más de 1/3 (37,8%) de los estafilococos aislados de IPA fueron considerados contaminaciones de la muestra y no verdaderas infecciones <sup>31</sup>.

Por su relevancia como patógeno y comensal de la piel humana, *S. epidermidis* es el más importante y más estudiado dentro del grupo de CoNS.

### **1.3. *Staphylococcus epidermidis***

En 1882, Ogston describió por primera vez el nombre *Micrococcus* a lo que actualmente se conoce como *S. epidermidis* <sup>32</sup>. Dos años más tarde, Rosenbach nombró al grupo de bacterias que producía colonias blancas en placas de agar sangre como *Staphylococcus albus*. En 1891, Welch las denominó *Staphylococcus epidermidis albus*, y en 1908, Winslow & Winslow lo volvieron a cambiar por *Albococcus epidermidis*. Finalmente, en 1916, Welch et al. lo denominan definitivamente como *Staphylococcus epidermidis* (Figura 4) <sup>33</sup>. *S. epidermidis* se caracteriza por crecer rápidamente en

agar sangre, formando colonias blancas de 1-2 mm de diámetro aproximadamente. En condiciones aeróbicas, puede producir ácido a partir de fructosa, maltosa, sacarosa y glicerol <sup>34</sup>.



**Figura 4.** Evolución de la nomenclatura de *S. epidermidis*.

*S. epidermidis* es la especie aislada con mayor frecuencia en los epitelios humanos, predominantemente en las axilas, cabeza y fosas nasales <sup>24</sup>. El análisis del genoma de *S. epidermidis*, demostró que presentan una gran variedad de genes que proporcionan protección contra las duras condiciones del ambiente externo <sup>24</sup>. La colonización de la piel por *S. epidermidis* ofrece al ser humano un amplio abanico de ventajas <sup>22</sup>:

- La limitación del acné.
- La secreción de sustancias antimicrobianas, como las modulinas solubles en fenol.
- La estimulación de la producción de péptidos antibacterianos.
- La prevención de la colonización nasal por *S. aureus* mediante la secreción de serin-proteasas.
- La neutralización del virus influenza con proteínas de unión a la matriz extracelular.
- La modulación de la respuesta inmune del huésped a través de ácidos lipoteicoicos estafilocócicos.

Por todos estos beneficios, existe un gran interés en el uso de *S. epidermidis* como principio activo en productos para el cuidado de la piel <sup>22</sup>.

Dada la abundancia de esta especie en la piel, es común que cuando se aísla un *S. epidermidis* en muestras clínicas, resulte difícil diferenciar una cepa invasiva de una contaminante <sup>24,30</sup>. Parece ser que hay una línea muy estrecha entre el comensalismo y la patogenicidad de *S. epidermidis*. En un estudio de artroplastias totales de cadera y rodilla infectadas, el 77% de los CoNS aislados fueron *S. epidermidis* <sup>35</sup>. Las infecciones causadas por *S. epidermidis* raramente resultan mortales, pero por su frecuencia y su dificultad en el tratamiento, son un problema grave para el sistema de salud pública <sup>24</sup>.

### 1.3.1. Patogenicidad

¿Y por qué una cepa menos virulenta, como es *S. epidermidis*, acaba siendo igual o incluso más patógena que *S. aureus*? Massey *et al.* desarrollaron un modelo matemático donde explicaban que *S. epidermidis* tiene la capacidad de transmitirse más fácilmente que *S. aureus*. Y esto sucede por tres motivos <sup>36</sup>:

1. *S. epidermidis* coloniza la piel humana en general, a diferencia de *S. aureus*, que se encuentra mayoritariamente en las fosas nasales.
2. Todos los humanos estamos colonizados por *S. epidermidis* y solo algunos por *S. aureus*.
3. Interferencias entre cepas de *S. aureus* con tipos diferentes de Agr (una proteína relacionada con la regulación genética que se comenta mas adelante), que se dan cuando una cepa de *S. aureus* de diferente tipo de Agr intenta invadir una cepa establecida de *S. aureus*. La cepa establecida satura los receptores de Agr de la cepa invasora para que no pueda unirse el receptor e induzca la funcionalidad de *agr* de expresar determinantes de virulencia, inhibiendo así la colonización de cualquier cepa recién transmitida con un tipo de Agr diferente. En cambio, en *S. epidermidis* no se ha demostrado ninguna interferencia entre los diferentes tipos de Agr en esta especie.



La patogenicidad de una bacteria no es suficiente para que se desarrolle una IPA, hay que tener en cuenta diversos factores: la carga bacteriana, factores de la bacteria, factores del huésped, la técnica quirúrgica, el campo quirúrgico, y la colonización del sitio quirúrgico <sup>8</sup>. Una infección se puede llevar a cabo por una contaminación externa o diseminación continua, por una diseminación hematológica desde otras partes del cuerpo, o por una infección recurrente <sup>4</sup>. Cuando las bacterias acceden al sitio quirúrgico, pueden quedarse en suspensión o formar una biopelícula/*biofilm*. Las bacterias en suspensión resultan más fáciles de identificar y de erradicar por el sistema inmune o por los antibióticos <sup>8</sup>. En el caso de las infecciones de cuerpos extraños, se produce una adhesión bacteriana en estos materiales por su superficie abiótica, que facilita la fijación y maduración del *biofilm* <sup>4,8</sup>. Con la presencia de un cuerpo extraño, la concentración bacteriana necesaria para inducir una infección se reduce más de 100.000 veces <sup>4,37</sup>. Además de formarse el *biofilm* en el implante, es posible también en el hueso y tejido fibroso, e incluso en el líquido sinovial <sup>8</sup>.

### 1.3.2. Formación del *biofilm*

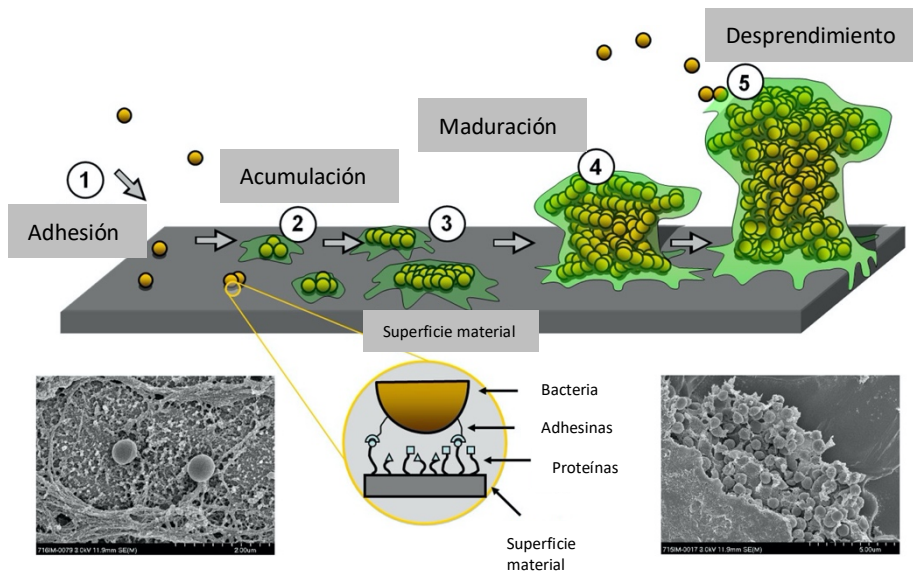
El *biofilm* es una estructura tridimensional de comunidades multicelulares microbianas encapsuladas en una matriz extracelular, conocida como sustancias poliméricas extracelulares, en inglés *extracellular polymeric substances* (EPS), sintetizada por el propio microorganismo <sup>4,8,37,38</sup>. Un *biofilm* maduro puede tardar unas cuatro semanas en formarse y estar compuesto por agrupaciones de una o varias especies bacterianas <sup>15</sup>. La formación del *biofilm* protege a las bacterias del sistema inmune del huésped y de los antibióticos, lo que dificulta el tratamiento de las IPA <sup>8</sup>. La resistencia bacteriana a los antibióticos puede aumentarse hasta 1.000 veces en un *biofilm* <sup>15</sup>. Adicionalmente, se ha descrito que el 75% de las infecciones asociadas al *biofilm* en dispositivos médicos, son producidas por *S. aureus*, *S. epidermidis* o *P. aeruginosa* <sup>8</sup>.

En la naturaleza, se ha demostrado globalmente que el 99% de las bacterias residen en *biofilms* formados en las superficies, y no como organismos flotantes <sup>8,38</sup>. Una de las razones es porque muchas bacterias viven en condiciones limitadas de nutrientes y en constante peligro de ser eliminadas, por ejemplo, por cambios ambientales drásticos (humedad o presión osmótica). En consecuencia, las bacterias forman comunidades en una matriz extracelular unidas a una superficie para protegerse del ambiente <sup>39</sup>.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), encapsulan las células del *biofilm*, unen a las células entre sí y a la superficie y están compuestas principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular <sup>38</sup>. La proximidad de las células interiores permite que las bacterias se comuniquen por señales químicas, como el sistema *quorum sensing*, o señales eléctricas, para modular la expresión génica y la transferencia horizontal de genes, como genes de virulencia y de resistencia a antibióticos <sup>8</sup>.

Una peculiaridad del *biofilm* es que, por su estructura, las bacterias centrales están privadas de nutrientes, a diferencia de las bacterias periféricas. Por esta razón, las bacterias centrales entran en un estado latente o estacionario, metabólicamente inactivo y sin crecimiento, que permite que puedan sobrevivir a altas concentraciones de antibiótico <sup>15</sup>. Además, estas bacterias son difíciles de cultivar en medios de cultivos ricos en nutrientes, lo que dificulta su identificación <sup>8</sup>.

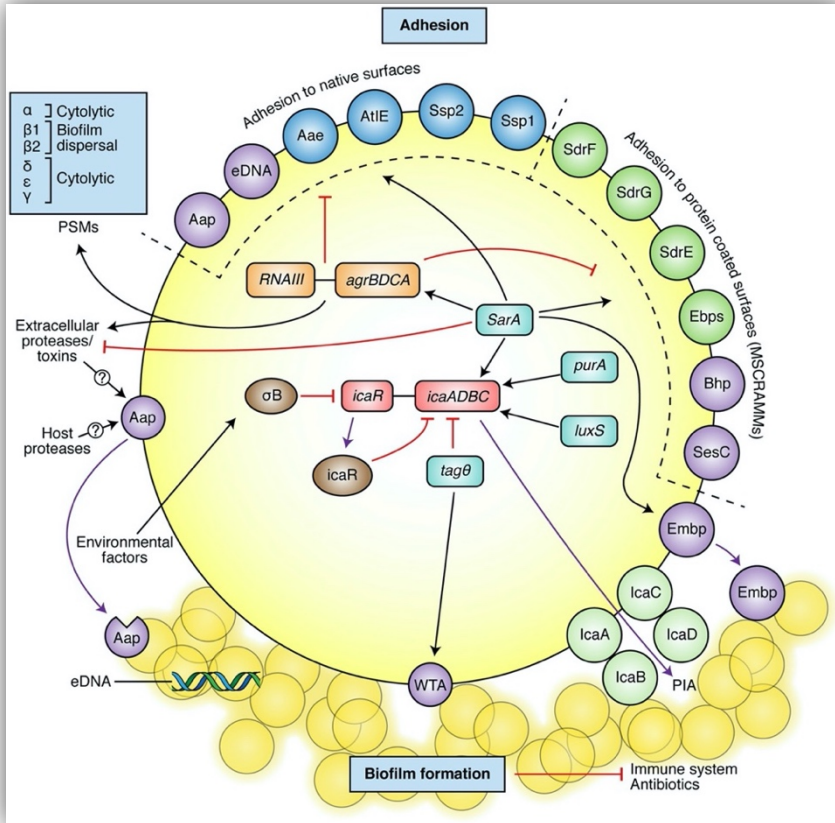
La formación del *biofilm* incluye 4 fases: adhesión, acumulación, maduración y desprendimiento (Figura 5). En cada fase se expresan una gran cantidad de genes específicos diferentes que regulan la formación del *biofilm*, los cuales pueden tener un papel importante en una o varias etapas (Tabla 5). Estos genes pueden facilitar la adhesión, aumentar la síntesis de determinados compuestos, y/o finalmente, provocar una disgregación de una parte del *biofilm* para poder colonizar nuevas áreas (Figura 6).



**Figura 5.** Esquema de la formación del *biofilm*. Se incluyen imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido. Adaptación de Brescó *et al.* <sup>40</sup>.

**Tabla 5.** Factores implicados en la formación del *biofilm*.

Fase	Proteína	Función
Adhesión	<b>AtIE</b> (autolisina bifuncional)	Adhesión inicial (unión a vitronectina y poliestireno)
	<b>SdrG/Fbe</b> (serina-aspartato que contiene proteína G repetida/proteína de unión al fibrinógeno)	Adhesión inicial (unión a fibrinógeno)
	<b>SdrF</b> (serina-aspartato que contiene proteína F repetida)	Adhesión inicial (unión a colágeno I)
	<b>SesI</b> (proteína I de superficie de <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	Adhesión inicial
Acumulación	<b>Operón <i>ica</i></b> ( <i>icaA/D/B/C/R</i> )	Adhesión intercelular, acumulación
	<b>Aap</b> (proteína asociada a la acumulación)	Adhesión intercelular, acumulación
	<b>Embp</b> (proteína de unión a la matriz extracelular)	Adhesión inicial (unión a fibronectina), adhesión intercelular, acumulación
	<b>Bhp</b> (proteína de <i>biofilm</i> asociada a la pared celular)	Adhesión inicial y adhesión intercelular
Maduración y desprendimiento	<b>PSMs</b> (modulinas solubles en fenol) ( $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon/\delta$ )	Maduración, Desprendimiento
	<b>Hld</b> (hemolisina delta)	Maduración, Desprendimiento
Sistema <i>Quorum Sensing</i>	<b>Agr</b> (proteína accesoria reguladora genética)	Regulación genética
	<b>LuxS</b> (S-ribosilhomocisteína liasa)	Regulación genética



**Figura 6.** Esquema de los mecanismos de patogenicidad de *S. epidermidis*. Incluyen moléculas de adhesión y de formación de *biofilm* <sup>40</sup>.

### 1.3.2.1. Fase de adhesión

El punto inicial es la adhesión de las células bacterianas a la superficie a colonizar, y por ello, es crucial para que se presente una infección. En esta fase están involucrados diferentes factores,

incluyendo los del huésped, los microbianos, los de la superficie, el tiempo de exposición, la carga superficial, la hidrofobicidad y la topografía<sup>30</sup>. La adhesión puede darse en una superficie abiótica o biótica. La fijación a una superficie abiótica, como la de un implante, se produce principalmente por interacciones débiles, transitorias y no específicas, como las interacciones hidrofóbicas o los enlaces de Van der Waals, y por interacciones específicas por las adhesinas o moléculas bacterianas asociadas a la superficie, como AtlE en *S. epidermidis*. En cambio, la adhesión a una superficie biótica, como el tejido humano, se da por interacciones mucho más específicas<sup>24,37,39</sup>. Los enlaces transitorios se van sustituyendo por enlaces más fuertes y duraderos a medida que va avanzando la fase de adhesión.

*S. epidermidis* expresa un tipo de proteínas ancladas a la superficie que se unen a la superficie de la matriz del huésped, conocidas como componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva, en inglés *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMM). Una vez insertado el implante, queda recubierto por plasma y proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, fibrinógeno, vitronecina, entre otras, lo que favorece la colonización por patógenos<sup>24,37,39,41</sup>.

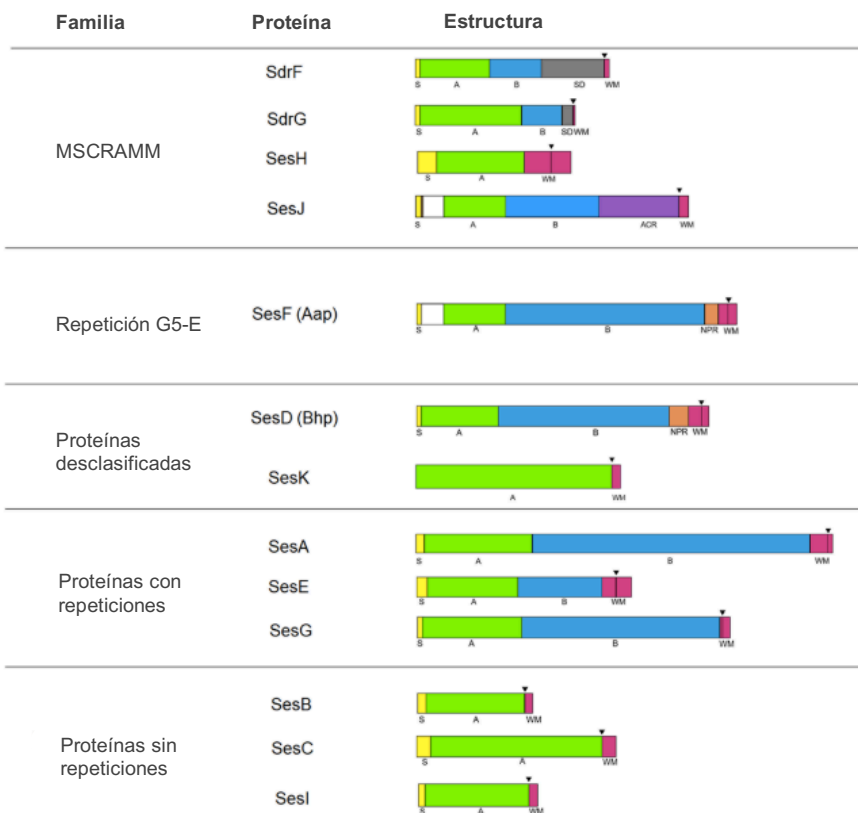
La molécula de adhesión más importante en *S. epidermidis* es la autolisina asociada a la superficie, codificada por el gen **atlE**<sup>3,42</sup>. AtlE

es una proteína de 115 kDa que desempeña un papel fundamental en la unión a la vitronectina y al poliestireno no modificado <sup>30,37,41</sup>.

Otras proteínas que también se han descrito como adhesinas son las proteínas de superficie de *S. epidermidis* (Ses). En *S. epidermidis* se han descrito 13 proteínas Ses: SdrF, SdrG, SesH, SesJ, SesF (Aap), SesD (Bhp), SesK, SesA, SesE, SesG, SesB, SesC y SesI (Figura 7) <sup>43</sup>.

Dentro de este grupo de proteínas, *S. epidermidis* expresa unas proteínas que se unen a las proteínas del huésped: las proteínas del grupo de proteínas de repetición de serina-aspartato (Sdr), pertenecientes a la familia de las proteínas MSCRAMM <sup>37</sup>. Específicamente, en *S. epidermidis* se han identificado SdrF, SdrG, SdrH/SesH y SesJ, siendo más relevantes las dos primeras.





**Figura 7.** Proteínas Ses en *S. epidermidis*. Adaptación de Ortega-Peña <sup>43</sup>. S: péptido señal de secreción (amarillo), A: región de ligando (verde), B: dominios repetidos (azul), SD: repeticiones de serina-aspartato (gris), WM: región que atraviesa la pared celular/membrana (rosa), NPR: repeticiones no perfectas (naranja), ACR: región de repetición que contiene ácido aspártico (violeta).

- **SdrG** es una proteína de 119 kDa, crucial para la adherencia a las superficies recubiertas de fibrinógeno, por eso, también es conocida como proteína de unión a fibrinógeno (Fbe) <sup>3,24,30,37,41</sup>. La proteína SdrG/Fbe tiene el epítipo de unión a fibrinógeno en

la región A y la unión se produce por interacciones con la cadena  $\beta$  del fibrinógeno <sup>30</sup>.

- **SdrF** presenta una organización similar a SdrG y regula la unión específica al colágeno tipo I. A diferencia de SdrG, el epítipo de unión a colágeno I se encuentra en la región B y la unión se produce por interacciones con las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del colágeno tipo I <sup>3,30,43</sup>.
- **SesI** puede promover la adherencia y la agregación bacteriana, pero no está involucrada en la maduración del *biofilm*, es decir, podría estar relacionada con la colonización y adhesión de *S. epidermidis* <sup>43</sup>. Adicionalmente, tiene propiedades inmunogénicas ya que provoca una respuesta inmune si el paciente está infectado por *S. epidermidis*, por lo tanto, SesI se expresa durante la infección <sup>44,45</sup>. Ha sido propuesta como marcador molecular para detectar cepas virulentas de *S. epidermidis*, pero no está suficientemente claro si las proteínas Ses están más asociadas con aislamientos de piel sana (comensales) o con aislamientos de infección <sup>43,45</sup>.

Además de todas las moléculas implicadas en esta primera fase, hay que tener en cuenta las propiedades de la superficie que también influyen en la adhesión, como la estructura química, rugosidad, hidrofilia, potencial Z y energía libre <sup>8</sup>. Comúnmente, los materiales ortopédicos suelen estar fabricados con cobalto-cromo, titanio, polietileno, polimetilmetacrilato y cerámica. Muchas

investigaciones han estado enfocadas a la modificación de la superficie del implante y los recubrimientos antimicrobianos para minimizar la adhesión de la bacteria e inhibir así la formación del *biofilm*. Sería una buena opción terapéutica ya que en este punto las bacterias aún no están protegidas <sup>8</sup>.

### 1.3.2.2. Fase de acumulación

Una vez que las bacterias están unidas a la superficie, se multiplican y se acumulan en una estructura tridimensional, multicelular y multicapa, dejando a la mayoría sin contacto con la superficie. Para facilitar el suministro de nutrientes a las capas más profundas y formar la estructura tridimensional típica del *biofilm*, se generan canales llenos de líquido <sup>24,46</sup>. Durante esta etapa, son importantes las propiedades adhesivas intercelulares ya que fomentan la agregación celular y la formación de la estructura del *biofilm* <sup>30,46</sup>.

La acumulación de agregados celulares bacterianos está favorecida por la síntesis de un polisacárido que actúa como adhesina intercelular, en inglés *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), uno de los componentes más importantes y abundantes en la matriz del *biofilm*, también denominado según su composición química poli-N-acetilglucosamina (PNAG) <sup>3,24,30,39</sup>. Otros componentes de la matriz de una biopelícula son polisacáridos, proteínas, ácidos teicoicos y ADN extracelular <sup>47</sup>.

Los genes implicados en la proliferación celular y la producción de PIA, se encuentran en el operón *ica*, que incluye cuatro genes (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*) y su represor (*icaR*)<sup>3,24,30,39,44,46,47</sup>.

- **IcaA** es una proteína de membrana integral N-acetilglucosaminiltransferasa que necesita IcaD para su actividad completa.
- **IcaD** es una proteína de membrana integral que puede actuar dirigiendo el plegamiento y como enlace entre IcaA e IcaC.
- **IcaC** es una proteína de membrana integral involucrada en la externalización y el alargamiento de PIA.
- **IcaB** es una proteína de superficie responsable de la desacetilación de PIA.
- **IcaR** funciona como represor y el gen se transcribe en la dirección opuesta al operón *ica*<sup>47</sup>.

Existen proteínas que deben considerarse proteínas multifuncionales ya que no tienen un papel exclusivo en la adhesión o acumulación, sino que intervienen en ambas fases. Es el caso de Embp, Aap y Bhp, que se describen a continuación.

- La proteína de unión a la matriz extracelular (**Embp**) es una proteína de superficie de unión a fibronectina, que tiene un papel funcional tanto en la adhesión primaria como en la adhesión intercelular<sup>3,30,46</sup>.

- La proteína asociada a la acumulación (**Aap/SesF**) es una proteína de unión a la superficie que tiene propiedades adhesivas intercelulares para la agregación celular y la formación del *biofilm* <sup>3,30,43,46</sup>. <sup>30</sup>.
- La proteína asociada al *biofilm* (**Bhp/SesD**), es otra proteína de superficie homóloga a Bap de *S. aureus* <sup>41</sup>. Además de ser una adhesina intercelular, también se ha visto que puede contribuir al carácter hidrofóbico de una superficie celular <sup>24</sup>.

En *S. epidermidis* existen dos vías de producción de *biofilm*: 1) PIA-dependiente o 2) PIA-independiente o dependiente de proteínas. El hecho de que *S. epidermidis* exprese Aap, no significa que necesariamente forme *biofilm*, ya que no es suficiente para mediar la adhesión intercelular de la fase acumulativa <sup>30,35</sup>. De igual manera, cepas de *S. epidermidis ica*/PIA negativas pueden formar *biofilm* por vía dependiente de proteínas en contextos clínicos <sup>3,30,39</sup>. Generalmente, un *biofilm* dependiente de PIA es más estructurado y robusto en comparación con un *biofilm* dependiente de proteínas como Embp y Aap. Es decir, en función de si el *biofilm* es dependiente de PIA, Aap o Embp, cambiará significativamente su morfología <sup>30,46</sup>. Parece ser que en *S. aureus* predomina el *biofilm* dependiente de proteínas, al contrario de *S. epidermidis*, que forma *biofilm* mayoritariamente por la vía PIA-dependiente <sup>47</sup>.

### 1.3.2.3. Fase de maduración

El *biofilm* se reorganiza continuamente y siguiendo la fase de acumulación evoluciona hasta la etapa de maduración. La maduración del *biofilm*, al igual que la fase acumulativa, incluye procesos adhesivos, para unir las comunidades bacterianas, y procesos disruptivos, para formar canales que ayuden a la distribución de los nutrientes y el oxígeno a las capas más internas.<sup>24,30</sup> Unos de los factores estructurantes del *biofilm* son las modulinas solubles en fenol (PSMs) (Ver apartado “Modulinas solubles en fenol (PSMs)”, más adelante) y PIA, que además de su importante función en la fase de acumulación, también está involucrada en la arquitectura del *biofilm* en maduración<sup>44</sup>. Finalmente, cuando el *biofilm* está completamente maduro, se vuelve menos compacto y robusto, procediendo a la fase de desprendimiento.

### 1.3.2.4. Fase de desprendimiento

La última etapa está caracterizada por el desprendimiento y la diseminación de grupos de *biofilm* desde la superficie del implante a otros sitios a través del torrente sanguíneo<sup>24,30</sup>. Las bacterias de este *biofilm* desprendido pueden ocasionar infecciones secundarias

en otras partes del cuerpo, como la endocarditis o la sepsis <sup>39</sup>. Se han propuesto dos mecanismos de desprendimiento: por degradación enzimática de exopolímeros del *biofilm* y por alteración de la interacción no covalente por moléculas con función detergente <sup>24</sup>.

### 1.3.3. Regulación del *biofilm*

#### 1.3.3.1. Sistema Quorum Sensing

Como hemos visto, para el desarrollo del *biofilm* son necesarias distintas etapas, las cuales están controladas por el sistema de *quorum sensing*. El sistema *quorum sensing* (QS) (comunicación célula-célula) es un mecanismo regulador que controla la expresión génica según la densidad celular en los microorganismos <sup>39</sup>. En *S. epidermidis* es conocido como regulador genético accesorio, en inglés *accessory gene regulator (agr)*. Los patógenos han desarrollado estos sistemas reguladores para adaptar la expresión de genes de virulencia a los cambios de las condiciones ambientales durante una infección <sup>48</sup>. Las señales del sistema QS son unos péptidos autoinductores (AIs) que a baja densidad celular se encuentran en baja concentración. Cuando alcanzan una cierta

densidad celular, se acumulan y se activa el regulador transcripcional, el cual regula la expresión de varios genes <sup>48</sup>.

A diferencia de otras bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, la inactivación del sistema *agr* facilita el éxito de los estafilococos en el desarrollo de infecciones asociadas a *biofilm*, ya que la disminución de la actividad del QS favorece la formación de un *biofilm* más grueso, reduce las respuestas proinflamatorias y mejora la supervivencia <sup>48</sup>.

En *S. epidermidis* además del sistema regulador *agr*, se encuentra el sistema ***luxS***, un sistema de señalización bacteriana generalizado. El gen *luxS* codifica la sintasa AI-2. Tiene un impacto similar a *agr* en la formación del *biofilm* con la diferencia de que actúa a través de la regulación transcripcional del operón *ica* <sup>48</sup>. Por esta razón, la producción de PIA y, en general, la etapa de acumulación, no está regulada a través del sistema *agr*, si no por el sistema *luxS* <sup>49</sup>.

### 1.3.3.2. Modulinas solubles en fenol (PSMs)

A diferencia de *S. aureus*, productor de una gran variedad de toxinas, *S. epidermidis* se limita principalmente a un tipo: modulinas solubles en fenol, en inglés *phenol-soluble modulins* (PSMs). Las PSMs son péptidos cortos,  $\alpha$ -helicoidales, anfipáticos, proinflamatorios y multifuncionales que se clasifican en seis tipos:



PSM $\alpha$ , PSM $\beta$ 1, PSM $\beta$ 2, PSM $\delta$ , PSM $\epsilon$  y PSM $\gamma$ /toxina  $\delta$ . En excepción, hay una PSM que no está codificada en el genoma central sino dentro del elemento móvil SCC*mec*, llamada PSM-*mec* <sup>24,39,46</sup>. Se pueden clasificar según su longitud en cortos (20-25 aminoácidos) o en largos (44-45 aminoácidos), como las PSM $\beta$  <sup>47</sup>. Todas las PSMs están bajo el control del sistema regulador *agr*. Las PSMs pueden tener varias funciones, incluyendo proinflamatorias, citolíticas, inflamatorias o de estructuración y desprendimiento del *biofilm* <sup>30,39</sup>.

La más destacada es la conocida hemolisina  $\delta$  o modulina  $\gamma$  soluble en fenol (PSM $\gamma$ ). La toxina  $\delta$  tiene una variedad de funciones en *S. epidermidis* <sup>41,50,51</sup>:

- Competir con otras especies bacterianas en la piel humana.
- Dar soporte a la defensa innata humana en la sangre.
- Actuar como leucocidina.
- Intervenir en iniciar la degradación del *biofilm* cuando se alcanza la densidad celular máxima.
- Producir la lisis de eritrocitos, neutrófilos, monocitos y otras células inmunes.

### 1.3.4. Otros sistemas de regulación

#### 1.3.4.1. Elementos genéticos móviles

La capacidad de adaptación genética de *S. epidermidis* a unas condiciones ambientales variables puede darse por la presencia de ciertos elementos de secuencia de inserción (IS). Se trata de elementos de ADN pequeños, móviles y autónomos que participan en la organización del genoma bacteriano. La inserción de múltiples copias de IS en el genoma puede generar nuevas variantes genotípicas y fenotípicas que favorezcan la adaptación de la bacteria a las diferentes condiciones ambientales, como las del entorno hospitalario <sup>52</sup>.

La secuencia de inserción **IS256** forma parte del transposón *Tn4001*, el cual confiere resistencia a los aminoglucósidos. Como se encuentra en múltiples copias en el genoma de *S. epidermidis*, puede interrumpir la producción de PIA o la función del sistema *agr* mediante la inserción en los loci *ica* o *agr*, respectivamente <sup>24,52</sup>. Por lo tanto, *IS256* puede intervenir en la formación de *biofilm* PIA-dependiente, en la expresión del gen de resistencia a aminoglucósidos y en la flexibilidad genética <sup>52</sup>.

Otro elemento móvil destacado en *S. epidermidis* es el elemento móvil catabólico de arginina, en inglés *arginine catabolic mobile*

*element* (**ACME**). Contiene el operón *arc* (genes *arcR/A/D/B/C*), el operón *opp3* (genes *opp3A/B/C/D/E*) y el operón *kdp* (genes *kdpE/D/A/B/C*). Cada grupo de genes codifica una ruta de arginina desaminasa, un transportador ABC oligopéptido permeasa y un transportador ABC de potasio, respectivamente <sup>53,54</sup>. Hasta la fecha, se han descrito seis tipos de ACME diferentes en *S. epidermidis*, según la presencia de los operones mencionados anteriormente: *arc* y *opp3* (tipo I), solamente *arc* (tipo II), solamente *opp3* (tipo III), *arc* y *kdp* (tipo IV), *arc*, *opp3*, *kdp* (tipo V) y solamente *kdp* (tipo VI) <sup>53-56</sup>. ACME desempeña un papel importante en la colonización de la piel humana y las superficies mucosas y en la evasión al sistema inmune del huésped, pero no está clara su contribución en la progresión de una infección <sup>54,55</sup>. Por eso, ACME no está comúnmente asociado con aislados causantes de infección, sino con especies colonizadoras <sup>55,57</sup>.

Es muy posible que el origen de ACME y otros elementos móviles (cassette *SCCmec*) presentes en *S. aureus* fuese en los CoNS, específicamente en *S. epidermidis*, en los cuales su diversidad y prevalencia es mayor que en *S. aureus*, y podría servir como su reservorio genético <sup>53</sup>.

### **1.3.5. Tipificación molecular de *S. epidermidis***

Las técnicas de tipificación molecular permiten conocer la epidemiología molecular, la clonalidad entre aislados, la evolución de especies y determinar vías de transmisión. Técnicas como *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *SCCmec typing* y *Whole Genome Sequencing* (WGS) son consideradas esenciales para el estudio epidemiológico <sup>58,59</sup>.

#### **1.3.5.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**

La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado, en inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), se describió por primera vez en 1984 y ha permitido estudiar la diversidad clonal entre especies <sup>60</sup>. Está basada en enzimas de restricción específicas que cortan el ADN cromosómico generando un patrón de bandas. La separación de los fragmentos de ADN se lleva a cabo por la aplicación de un campo eléctrico de impulsos alternativos, no uniformes y orientados perpendicularmente, a través de un gel de agarosa. Mediante el análisis de los patrones de bandas aplicando los criterios establecidos por Tenover *et al.*, se pueden determinar las similitudes genéticas entre dos o más aislados y si tienen la misma procedencia evolutiva <sup>61</sup>.

*S. epidermidis* se caracteriza por presentar una alta diversidad genómica, mientras que otras especies de CoNS muestran una menor diversidad, como *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* y *S. schleiferi*<sup>23</sup>.

### 1.3.5.2. Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

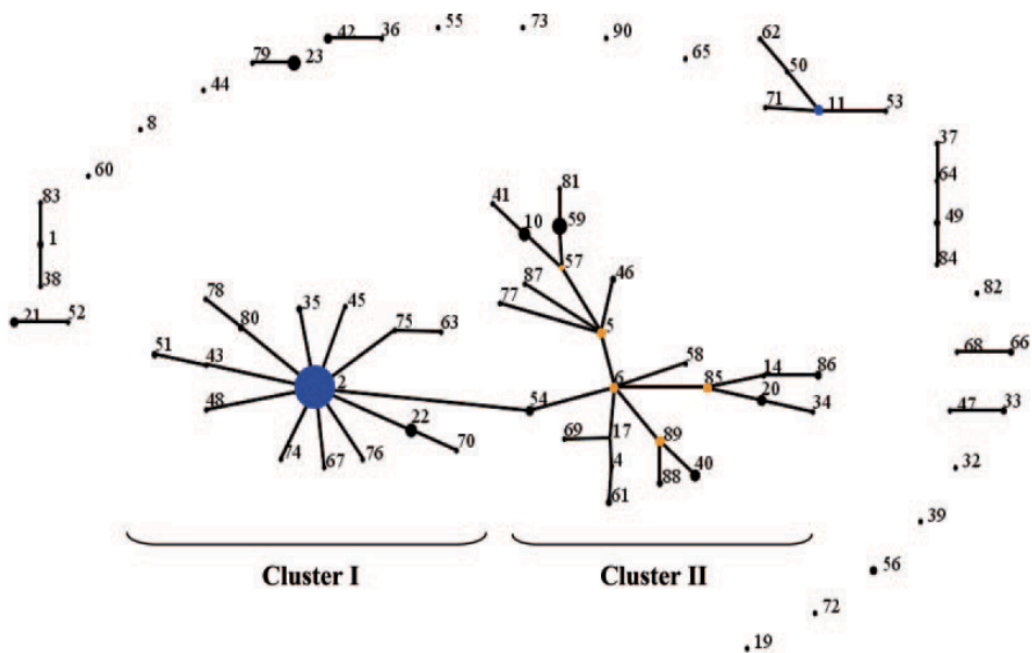
La tipificación multilocus de secuencias, en inglés *Multilocus Sequence Typing* (MLST), es un método basado en la secuenciación del ADN para estudios de epidemiología global y poder conocer la estructura poblacional y la diseminación geográfica. Esta técnica se basa en la secuenciación de siete genes muy conservados, en inglés *housekeeping genes*, para obtener un perfil alélico, una secuencia tipo (ST) y un complejo clonal (CC)<sup>62</sup>. Gracias a la técnica de MLST, se ha observado un alto grado de diversidad en *S. epidermidis*, actualmente hay descritos 992 STs (Octubre de 2020) (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-epidermidis/>).

Para la agrupación de STs en complejos clonales (CCs) se utiliza el algoritmo eBURST (<http://eburst.mlst.net>), el cual agrupa STs cuando hay una diferencia alélica de un alelo. Una limitación es que no están definidos los CCs en la base de datos de MLST de *S. epidermidis*, y el eBURST sólo permite agrupar los STs sin definir el número de CC, en la mayoría de casos. En la Tabla 6 se observa la

clasificación de STs y los correspondientes CCs recogidos en varios estudios <sup>63</sup>. La mayoría de aislados de *S. epidermidis* se agrupan en el complejo clonal 2 (CC2), que incluye el ST2, el secuenciotipo identificado con mayor frecuencia en esta especie <sup>24</sup>. El ST2 está ampliamente distribuido en cepas de *S. epidermidis* en el ambiente hospitalario de Europa y Estados Unidos, y además difiere de los clones de la comunidad <sup>23,27</sup>. En la Figura 8, se observan las agrupaciones realizadas por el algoritmo eBURST de los datos de MLST de una colección de *S. epidermidis*, donde la mayoría de las cepas se agrupan en el CC2, el cual se subdivide en el Cluster I y Cluster II.

**Tabla 6.** Clasificación de secuenciotipos (STs) en complejos clonales (CCs).

Complejo Clonal (CC)	Secuenciotipos (STs)
<b>CC2-I</b>	2, 16, 22, 35, 43, 45, 48, 51, 54, 63, 67, 70, 74, 75, 76, 78, 80
<b>CC2-II</b>	4, 5, 6, 10, 14, 17, 20, 34, 40, 41, 46, 57, 58, 59, 61, 69, 77, 81, 85, 86, 87, 88, 89, 110, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 157, 159
<b>CC23</b>	23, 79
<b>CC11</b>	11, 50, 53, 62, 71
<b>CC21</b>	21, 52
<b>CC42</b>	36, 42
<b>CC49</b>	37, 49, 64, 84
<b>CC1</b>	1, 38, 83
<b>CC66</b>	66, 68
<b>CC33</b>	22, 47



**Figura 8.** Aplicación del algoritmo eBURST en datos de MLST de 217 cepas de *S. epidermidis* del estudio de Miragaia *et al.* <sup>63</sup>.

### 1.3.5.3. Secuenciación del genoma completo (WGS)

La secuenciación del genoma completo o secuenciación masiva, en inglés *whole genome sequencing* (WGS), ha permitido grandes avances en la epidemiología de *S. epidermidis* en los últimos años. Y eso es porque se trata de una técnica que permite obtener millones de secuencias de ADN paralelamente de manera muy rápida y cada vez con costes más reducidos. Además, la WGS puede detectar todo



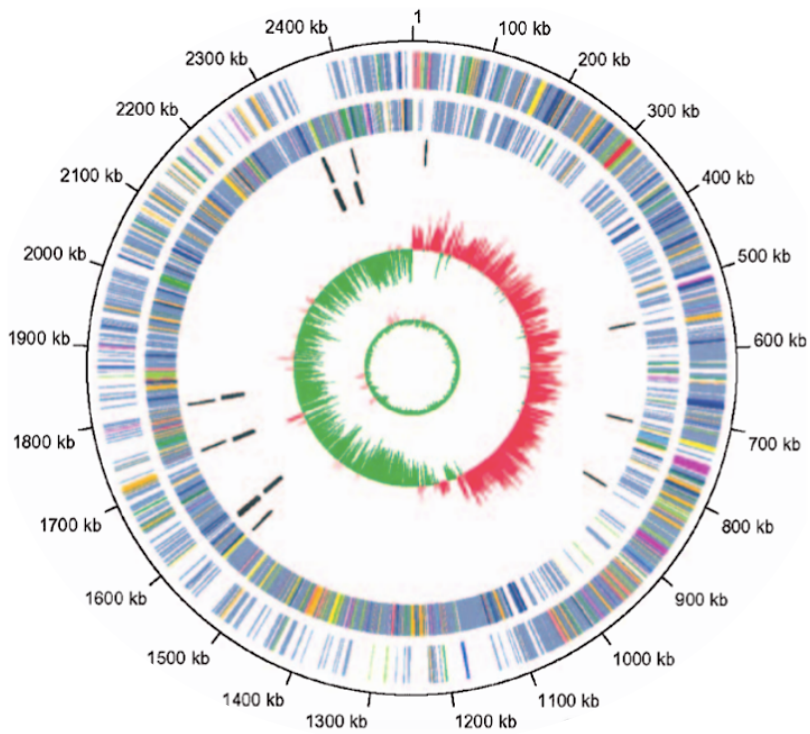
tipo de variaciones genómicas en un mismo experimento, incluyendo variantes de nucleótido único, en inglés *Single Nucleotide Variants* (SNVs), mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, inversiones y traslocaciones, y deleciones o duplicaciones<sup>64</sup>. Además, se puede realizar un estudio de los genes de virulencia y genes de resistencia, entre otras detecciones.

La Tabla 7 proporciona una lista con las definiciones de los términos más utilizados en el ámbito de la WGS y de su análisis<sup>65</sup>.

**Tabla 7.** Lista de los términos más utilizados relacionados con *Whole Genome Sequencing*.

Término	Definición
<b>Plataforma de secuenciación</b>	Sistema de secuenciación de ADN (secuenciador y metodología para secuenciar el ADN).
<b>Read</b>	Secuencia de ADN continua determinada a partir de un organismo.
<b>Locus</b>	Lugar específico del cromosoma que determina la localización de un gen o de una secuencia de ADN.
<b>SNV (Single nucleotide variation)</b>	Variación en una base de un solo nucleótido en una posición específica del genoma, sin implicar con que frecuencia ocurre esta variación en una población.
<b>SNP (Single nucleotide polymorphism)</b>	Variación en una única base en una posición específica del genoma, y relativamente común en una población. Suele atribuirse a una localización cromosómica específica que puede estar asociada a un fenotipo.
<b>k-mers</b>	Subsecuencias de longitud $k$ dentro de una secuencia de ADN. Por ejemplo, 3-mers se compone de 3 nucleótidos y 4-mers de 4 nucleótidos. Se comparan las frecuencias de un conjunto de $k$ -mers en el genoma de una especie o en una región genómica para detectar variaciones génicas/intergénicas.
<b>Pan genome</b>	Colección de todos los genes de todas las cepas de una especie, es decir, la suma del genoma central ( <i>core genome</i> ) y del genoma accesorio ( <i>accessory genome</i> ).
<b>Core genome</b>	Conjunto de genes conservados presentes en prácticamente todos los aislados de una especie.
<b>Accessory genome</b>	Conjunto variable de genes presentes en algunos, pero no en todos los aislados de una especie.
<b>Ensamblaje del genoma</b>	Las secuencias de ADN de un organismo se ensamblan de nuevo a partir de secuencias de <i>reads</i> superpuestas.

Actualmente, hay 822 genomas ensamblados de *S. epidermidis* disponibles en GenBank (Octubre de 2020), de los cuales sólo 29 son del genoma completo (Figura 9). En la Tabla 8 se muestran diferentes estudios que han secuenciado genomas completos de cepas de *S. epidermidis* <sup>66-71</sup>. Según los datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/155>), la media del tamaño del genoma de *S. epidermidis* es de 2,5166 Mb, el número de proteínas es de 2328 y tiene un 32% de contenido GC.



**Figura 9.** Representación circular del cromosoma de la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis* <sup>71</sup>.

**Tabla 8.** Secuenciación del genoma completo de *S. epidermidis*.

Estudio	Año	Cepa	GenBank	Tamaño genoma (pb)	Secuencias de codificación/proteínas	Genes ARN	% GC
<b>Galac MR et al.</b>	2019	CSF41 498	CP030246- CP030249	2.481.008	2.427	82	32,2
<b>MacLea KS et al.</b>	2017	ATCC 12228	CP022247- CP022252	2.570.371	2.462	83	32,1
<b>Galac MR et al.</b>	2017	1457	CP020462	2.454.929	2.260	81	32,3
<b>Gill SR et al.</b>	2005	RP62a	CP000029	2.643.840	2.455	80	32,2
<b>Davenport KW et al.</b>	2014	AmMS 205	CP009046	2.500.626	2.347	78	32,1
<b>Zhang YQ et al.</b>	2003	ATCC 12228	AE015929	2.499.279	2.419	76	32,1

### 1.3.6. Resistencia a antibióticos

En los últimos años, la incidencia de IPA causada por bacterias multirresistentes se ha incrementado drásticamente, probablemente por el uso excesivo, y a veces inapropiado, de antibióticos <sup>4,31</sup>. Esto provoca un aumento de los costos y la morbilidad porque el tratamiento de las IPAs se complica en comparación con infecciones causadas por bacterias sensibles <sup>31</sup>. Combatir microorganismos resistentes a múltiples clases de

antimicrobianos ha sido un reto en los últimos años y se necesita el desarrollo de antibióticos con nuevos mecanismos de acción.

Las tasas de resistencia de CoNS, *S. epidermidis* y *S. aureus* encontradas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en el año 2019, implicados en diferentes infecciones, se indican en la Tabla 9. Según los datos del Resumen de Sensibilidad a los antimicrobianos de las bacterias aisladas durante el año 2019 (<http://santpau.cat/es/web/public/resums-de-sensibilitat>), se observan las tasas de resistencia más elevadas en *S. epidermidis*, en comparación con *S. aureus* y el resto de CoNS, al igual que en un estudio realizado por Drago et al.<sup>31</sup>. Las tasas más altas en *S. epidermidis* se observaron en penicilina (95,2%), oxacilina (74,7%) y eritromicina (71,5%), manteniendo la sensibilidad a vancomicina (0%), teicoplanina (1,6%) y linezolid (1,2%).

**Tabla 9.** Tasas de resistencia antimicrobiana de CoNS, *S. epidermidis* y *S. aureus* en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en el año 2019 (<http://santpau.cat/es/web/public/resums-de-sensibilitat>).

Microorganismo	PEN	OXA	ERY	CLI	CIP	COT	MUP	GEN	RIF	FUS	VAN	TCO	LIN
<b>CoNS</b>	90,9	61,7	65	44,5	55,7	42,7	48,2	43,8	5,3	23,2	0	2,1	0,7
<b><i>S. epidermidis</i></b>	95,2	74,7	71,5	49	66,7	48,2	60,2	50,6	7,2	26,1	0	1,6	1,2
<b><i>S. aureus</i></b>	88,3	28	38,5	25,4	31,4	0	5,8	5,9	0,3	1,9	0	0	0

PEN: Penicilina; OXA: Oxacilina; ERY: Eritromicina; CLI: Clindamicina; CIP: Ciprofloxacino; COT: Cotrimoxazol; MUP: Mupirocina; GEN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; FUS: Ácido Fusídico; VAN: Vancomicina; TCO: Teicoplanina; LIN: Linezolid.

En comparación con otros estudios donde también determinaron las tasas de resistencia antimicrobiana de *S. epidermidis* en sus hospitales (Tabla 10) <sup>34,72-74</sup>, se observaron bastantes diferencias entre ellos, aunque normalmente coincidían en que las tasas más altas se observaban en penicilina, oxacilina y eritromicina. Por lo tanto, los porcentajes de resistencia pueden variar entre hospitales ya que cada uno tiene su régimen de administración de antibióticos.

**Tabla 10.** Comparación de tasas de resistencia de antibióticos de *S. epidermidis* en diferentes estudios.

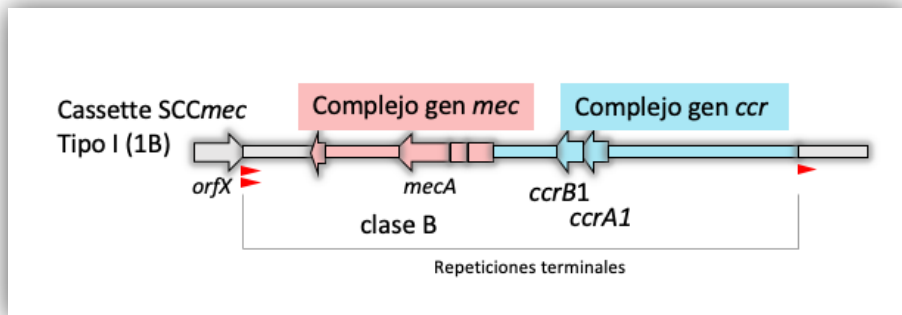
Estudios	PEN	OXA	ERY	CLI	CIP	COT	MUP	GEN	RIF	FUS	VAN	TCO	LIN
<b>HSP (España)</b>	95,2	74,7	71,5	49	66,7	48,2	60,2	50,6	7,2	26,1	0	1,6	1,2
<b>Ortega-Peña et al. (México)</b> <sup>72</sup>	82	78	39	27	60	41	ND	35	10	ND	0	ND	0
<b>Salih et al. (Suecia)</b> <sup>73</sup>	ND	74,9	62,8	57,4	ND	73,2	1,6	71	28,4	44,3	ND	ND	ND
<b>Lourtet-Hascoët et al. (Francia)</b> <sup>74</sup>	93	69,7	61,2	42,6	ND	49,6	ND	49,6	30,2	ND	1,5	18,6	0
<b>Eladli et al. (Arabia Saudí)</b> <sup>34</sup>	ND	89	60	37	ND	40	ND	54	14	14	0	0	97

ND: no determinado; HSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; PEN: Penicilina; OXA: Oxacilina; ERY: Eritromicina; CLI: Clindamicina; CIP: Ciprofloxacino; COT: Cotrimoxazol; MUP: Mupirocina; GEN: Gentamicina; RIF: Rifampicina; FUS: Ácido Fusídico; VAN: Vancomicina; TCO: Teicoplanina; LIN: Linezolid.

En *S. epidermidis* se diferencian las cepas resistentes a meticilina, en inglés *methicillin-resistant S. epidermidis* (MRSE) y las cepas sensibles a meticilina, en inglés *methicillin-susceptible S. epidermidis* (MSSE). Los MRSE han adquirido resistencia a otros antibióticos, incluidos rifampicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y sulfonamidas, ya que los genes de resistencia suelen encontrarse con más frecuencia en cepas MRSE que en MSSE <sup>24</sup>.

### 1.3.6.1. Cassette cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

El gen *mecA*, responsable de la resistencia a meticilina, se encuentra en un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico *mec*, en inglés *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). SCC*mec* está compuesto por repeticiones terminales invertidas y directas, un complejo de recombinasas sitio-específicas (*ccr*), el complejo de *mecA* (*mec*), y un sitio de inserción cromosómico específico dentro de un *open reading frame* conservado (*orfX*) (Figura 10) <sup>58,75</sup>.



**Figura 10.** Estructura del cassette SCC*mec* tipo I (1B).

El complejo *mec* se clasifica en seis clases diferentes (A, B, C1, C2, D y E) y el complejo *ccr* en tres tipos (*ccrA*, *ccrB* y *ccrC*), indicados en la Tabla 11 y Tabla 12, respectivamente. El complejo *ccr* codifica recombinasas involucradas en la integración y escisión de SCC*mec* en el cromosoma <sup>27,57,76</sup> ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).



**Tabla 11.** Complejo *mec* ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).

Clase <i>mec</i>	Componentes	Tipos SCC <i>mec</i>
<b>Clase A</b>	<i>IS431-mecA-mecR1-mecI</i>	II, III, VIII
<b>Clase B</b>	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272</i>	I, IV, VI
<b>Clase C1</b>	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	VII, X
<b>Clase C2</b>	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	V, IX
<b>Clase D</b>	<i>IS431-mecA-ΔmecR1</i>	
<b>Clase E</b>	<i>blaZ-mecALGA251-mecR1LGA251-mecILGA251</i>	XI

**Tabla 12.** Complejo *ccr* ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).

Tipo <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>	Tipos SCC <i>mec</i>
<b>Tipo 1</b>	A1B1	I, IX
<b>Tipo 2</b>	A2B2	II, IV
<b>Tipo 3</b>	A3B3	III
<b>Tipo 4</b>	A4B4	VI, VIII
<b>Tipo 5</b>	C1	V, VII
<b>Tipo 6</b>	A5B3	-
<b>Tipo 7</b>	A1B6	X
<b>Tipo 8</b>	A1B3	XI

Los diferentes tipos de *SCCmec* se definieron mediante combinaciones binarias de los complejos *mec* y *ccr*. De acuerdo con el Grupo de Trabajo Internacional sobre elementos del Cassette Cromosómico Estafilocócico, en inglés *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome*

*Elements* (IWG-SCC) <sup>77</sup>([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)), los tipos *SCCmec* se designaron con números romanos según el orden de descubrimiento y seguidamente el tipo *ccr* y la clase *mec* (Tabla 13): tipo I (1B) tipo II (2A), tipo III (3A), tipo IV (2B), tipo V (5C2), tipo VI (4B), tipo VII (5C1), tipo VIII (4A), tipo IX (1C2), tipo X (7C1) y tipo XI (8E).

**Tabla 13.** Tipos de *SCCmec* ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).

	<i>ccr</i> (tipo)	<i>mec</i> (clase)
<b>I</b>	1 (A1B1)	B
<b>II</b>	2 (A2B2)	A
<b>III</b>	3 (A3B3)	A
<b>IV</b>	2 (A2B2)	B
<b>V</b>	5 (C1)	C2
<b>VI</b>	4 (A4B4)	B
<b>VII</b>	5 (C1)	C1
<b>VIII</b>	4 (A4B4)	A
<b>IX</b>	1 (A1B1)	C2
<b>X</b>	7 (A1B6)	C1
<b>XI</b>	8 (A1B3)	E

Hasta la fecha, se han descrito XI tipos de *SCCmec* en estafilococos, mientras que los tipos XII (9C2) y XIII (9A) han sido aprobados por el IWG-SCC, aunque aún no figuran oficialmente en la página web. Pero la gran diversidad genética que presenta *SCCmec* en *S.*

*epidermidis* parece indicar que se están descubriendo continuamente nuevos tipos de *SCCmec* en todo el mundo y que se describirán en los próximos años <sup>26,27,75</sup>. Se han identificado elementos *SCCmec* que son portadores de más de un tipo de *ccr* <sup>57</sup>, una de las causas de la gran variabilidad que presenta *S. epidermidis*.

Los tipos *SCCmec* pueden clasificarse en subtipos por diferencias en las distintas regiones que rodean los complejos *ccr* y *mec*, las conocidas regiones de unión o *junkyard/joining* (J), unos componentes no esenciales, pero pueden tener determinantes adicionales de resistencia antibiótica <sup>57,58</sup>. Las regiones J varían en longitud y se componen de tres regiones: J1 (entre *ccr* y la región cromosómica de flanco derecho), J2 (entre *ccr* y *mec*) y J3 (entre *mec* y *orfX*) <sup>58,75,78</sup>.

Además, los CoNS resistentes a meticilina (MR-CNS) han sido identificados como un reservorio de *SCCmec*, siendo una fuente de adquisición para *S. aureus* por transferencia horizontal <sup>26,55,57</sup>. Por eso, *SCCmec* no forma parte del genoma natural de *S. aureus* y sí de diferentes especies CoNS, pudiendo tener hasta más de un *SCCmec* en su genoma <sup>57</sup>. Evidencias como: (1) la mayor frecuencia de *SCCmec* se encuentra en CoNS en comparación con *S. aureus*, (2) la transferencia horizontal de genes de resistencia desde CoNS a *S. aureus*, (3) la flexibilidad del genoma de *S. epidermidis*, (4) la conservación especie-independiente de elementos *ccr*, (5) la alta probabilidad de que CoNS tengan varios tipos de *ccr*, (6) la gran

diversidad de elementos *SCCmec* encontrados en CoNS, (7) y la alta prevalencia de MR-CNS independientemente de la región geográfica, confirman que *S. epidermidis*, y en general las especies CoNS, son el reservorio de *SCCmec* <sup>27</sup>.

### **1.3.6.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos**

La resistencia a antibióticos se genera por diferentes mecanismos de resistencia que adquieren las bacterias. En general, los más comunes en estafilococos son (Tabla 14) <sup>25</sup>:

- La modulación de la permeabilidad de la pared celular.
- La inactivación enzimática del antimicrobiano.
- La modificación de la diana del antibiótico.
- La expulsión activa del antimicrobiano por bombas de flujo.

**Tabla 14.** Genes de resistencia a antibióticos más comunes en *S. epidermidis*.

Antibiótico	Gen	Mecanismo de acción
<b>Oxacilina</b>	<i>mecA</i> (proteína de unión a penicilina 2/PBP2)	
<b>Eritromicina</b>	<i>ermA</i> (metilasa)	Modificación de la diana
	<i>ermB</i> (metilasa)	
	<i>ermC</i> (metilasa)	
	<i>msrA</i> (bomba de expulsión)	Bombas de expulsión
	<i>mphC</i> (fosfotransferasa)	Inactivación enzimática
<b>Clindamicina</b>	<i>lnu(A)</i> (proteína de resistencia a lincomicina)	Inactivación enzimática
<b>Cotrimoxazol</b>	<i>dhfrS</i> (dihidrofolato reductasa)	Modificación de la diana
<b>Linezolid</b>	<i>cfr</i> (metiltransferasa de la subunidad larga de ARN ribosomal)	Modificación de la diana
	<b>rRNA 23S</b>	Modificación de la diana
	<b>L3, L4, L22</b>	Modificación de la diana
<b>Aminoglicósidos</b>	<i>aac(6')-Ib_aph(6)-Ia</i> (6' N-acetiltransferasa /2' fosfotransferasa)	Inactivación enzimática
	<i>ant(4')-IaC</i> (adeniltransferasa aminoglicosídica)	Inactivación enzimática
<b>Quinolonas</b>	<i>gyrA/gyrB</i> (topoisomerasa II/ADN girasa)	Modificación de la diana
	<i>griA/griB</i> (topoisomerasa IV)	Modificación de la diana
<b>Rifampicina</b>	<i>rpoB</i> (ARN polimerasa)	Modificación de la diana

### 1.3.6.3. Resistencia a $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos centran su mecanismo de acción en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana <sup>79</sup>. La diana de los  $\beta$ -lactámicos son las proteínas de unión a la penicilina, en inglés *Penicillin binding proteins* (PBPs), involucradas en la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana. La unión del antibiótico a la PBP provoca una inactivación, impidiendo así la síntesis del peptidoglucano, y en consecuencia, la formación de la pared celular y el crecimiento de la bacteria <sup>25,80</sup>.

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos en los estafilococos se explica por dos mecanismos <sup>81,82</sup>:

- La inactivación enzimática por las  $\beta$ -lactamasas codificadas por *blaZ*. Las betalactamasas producidas en los estafilococos son las penicilinasas y su prevalencia es de un 80-85% aproximadamente <sup>83</sup>.
- El reemplazo del sitio diana por *mecA* o *mecC*. La resistencia a meticilina (y a la oxacilina), y a prácticamente todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con la excepción de ceftarolina y ceftobiprole, se asocia con la presencia del gen de resistencia a meticilina (*mecA*), que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a) <sup>57,76,84,85</sup>. Globalmente, más del 99% de estafilococos resistentes a meticilina pueden contener el gen *mecA* como mecanismo de resistencia a meticilina <sup>86</sup>. El gen *mecC* fue descrito en 2011 en *S. aureus* como un nuevo gen

de resistencia a meticilina, y su prevalencia en estafilococos resistentes a meticilina es mucho menor al *mecA* (0-2,8%), y parece ser poco común en humanos <sup>85,86</sup>.

#### 1.3.6.3.1. Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS<sub>B</sub>)

La familia de macrólidos interfiere en la síntesis proteica mediante la unión reversible al 23S ARNr de la subunidad 50S del ribosoma. De igual manera, las lincosamidas actúan inhibiendo la síntesis proteica por la unión a la subunidad 50S del ribosoma, en una región próxima a los macrólidos <sup>79</sup>. La resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS<sub>B</sub>) depende de la adquisición de genes de resistencia <sup>81,87</sup>:

- Genes ***erm*** (resistencia a MLS<sub>B</sub>)

La resistencia combinada a MLS<sub>B</sub> viene dada por los genes *erm*, el mecanismo más frecuente, que codifican metilasas modificadoras del 23S ARNr y, en consecuencia, reducen o inhiben la unión de los antibióticos MLS<sub>B</sub> al ribosoma <sup>25,81,83,88</sup>.

Los genes descritos en estafilococos son los *erm* de las clases A, B, C, F, T, 33, 43, 44, 45 y 48 (<http://faculty.washington.edu/marilynr/ermweb4.pdf>), siendo *ermC* el más predominante en *S. epidermidis* <sup>88,89</sup>.

- Genes ***msr*** (resistencia a macrólidos y estreptograminas B)

En la resistencia combinada a macrólidos y estreptograminas B (sin lincosamidas) está implicado el gen *msr(A)* que codifica proteínas ABC-F (bombas de expulsión)<sup>88</sup>. Las proteínas ABC-F involucradas en esta resistencia, actúan protegiendo a los ribosomas de los efectos inhibitorios de los antibióticos<sup>81</sup>.

- Genes ***mph*** (resistencia a macrólidos)

El mecanismo de resistencia por la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos se produce por el gen *mph(C)*, que codifica una fosfotransferasa de macrólidos que confiere solo resistencia a esta familia de antimicrobianos<sup>88</sup>.

- Genes ***lnu(A)*** (resistencia a lincosamidas)

La resistencia únicamente a las lincosamidas está mediada por el gen *lnu(A)* que codifica una nucleotidiltransferasa de lincosamida<sup>81</sup>. Al igual que *mph(C)*, su mecanismo de resistencia está basado en producir enzimas inactivadoras, en este caso de lincosamidas<sup>88</sup>.

#### 1.3.6.3.2. Resistencia a aminoglucósidos

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se basa en la inhibición proteica y actúan principalmente en la subunidad 30S. La unión a los ribosomas y su posterior bloqueo, impiden la síntesis de proteínas<sup>79</sup>. La resistencia a los aminoglucósidos está basada en una



serie de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que inhiben la unión de los ribosomas <sup>25</sup>. Entre los genes más frecuentes relacionados con esta resistencia en estafilococos se encuentran:

- El gen ***aacA-aphD*** o *aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia*, que codifica una enzima acetiltransferasa y fosfotransferasa que confiere resistencia a la gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina.
- El gen ***aadD*** o *ant(4′)-Ia*, que codifica una enzima adeniltransferasa que confiere resistencia a la kanamicina, neomicina y tobramicina <sup>81</sup>.

#### 1.3.6.3.3. Resistencia a linezolid

El linezolid pertenece a la familia de oxazolidinonas, las cuales inhiben la síntesis proteica y evitan la formación del complejo de iniciación 70S. El linezolid se centra concretamente en la subunidad ribosómica 50S, en el 23S ARNr <sup>79</sup>. La resistencia a linezolid está mediada generalmente por <sup>85,90</sup>:

- Mutaciones en la diana del fármaco (**23S ARNr**).
- Mutaciones en las proteínas ribosomales 50S (**L3, L4, L22**).
- Adquisición del gen de resistencia a linezolid ***cfr***.

El mecanismo de resistencia a linezolid más común son las mutaciones en el ARNr 23S y la adquisición del gen *cfr* <sup>91</sup>. El gen *cfr*

codifica una metilasa, la cual interfiere con la unión de fármacos de unas cinco clases de antimicrobianos (fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptograminas A) <sup>81,90,92</sup>. Las mutaciones en los genes *rplC* y *rplD*, que codifican las proteínas L3 y L4 respectivamente, son poco frecuentes. Pueden coexistir en la misma cepa diferentes combinaciones de los mecanismos de resistencia a linezolid <sup>83</sup>.

#### 1.3.6.3.4. Resistencia a tetraciclina

Al igual que las familias de antibióticos anteriores, las tetraciclinas detienen la síntesis proteica, mediante la unión a la subunidad 30S del ribosoma <sup>79</sup>. Aunque la resistencia a tetraciclina es poco frecuente en estafilococos, puede ser debida a la presencia de los siguientes genes <sup>81,85</sup>:

- *tet(K)* y *tet(L)*, que codifican unas proteínas asociadas a la membrana y solo confieren resistencia a tetraciclina.
- *tet(M)*, que codifica una proteína protectora de ribosomas y no solo causa resistencia a tetraciclina, sino que también a doxiciclina y minociclina.

#### 1.3.6.3.5. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol)

El cotrimoxazol es la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (1:5). El trimetoprim pertenece a la familia de las diaminopirimidinas y el sulfametoxazol a la de las sulfamidas. Ambas familias de antibióticos actúan bloqueando la síntesis de factores metabólicos, como el ácido folínico <sup>79</sup>. La resistencia a trimetoprim implica cuatro genes: *dfrA* (o ***dfrS1***), *dfrD*, *dfrG* y *dfrK*, los cuales codifican reductasas de dihidrofolato <sup>81</sup>.

#### 1.3.6.3.6. Resistencia a ácido fusídico

El ácido fusídico provoca la inhibición de la síntesis proteica debida a la unión a un complejo formado por el ribosoma <sup>79</sup>. La resistencia al ácido fusídico puede producirse por la expresión de los genes *fusB* y *fusC* o por mutaciones en el gen *fusA*. El gen *fusB* protege el sistema de traducción de la inhibición que provocaría el ácido fusídico <sup>81</sup>.

#### 1.3.6.3.7. Resistencia a fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas/quinolonas centran su mecanismo de acción en el bloqueo de las topoisomerasas II (ADN girasa) y IV, ambas encargadas del superenrollamiento y desenrollamiento del ADN,

necesarios para la síntesis de ADN. La resistencia a fluoroquinolonas se basa en mutaciones en las subunidades GrIA y GrIB (ADN topoisomerasa IV) y GyrA y GyrB (ADN topoisomerasa II/ADN girasa), las cuales provocan sustituciones de aminoácidos en las regiones que determinan la resistencia a quinolonas <sup>81,85</sup>.

#### **1.3.6.3.8. Resistencia a rifampicina**

La rifampicina pertenece a la familia de las rifamicinas, encargadas de inhibir la síntesis de ARNr y ARNm por el bloqueo de la ARN polimerasa, lo que evita el inicio del proceso de transcripción <sup>79</sup>. La resistencia a rifampicina se puede dar por mutaciones en el gen *rpoB*. Este gen codifica una ARN polimerasa, la cual contiene la subunidad  $\beta$  donde se une la rifampicina <sup>81</sup>.

## **1.4. Tratamiento de las infecciones protésicas**

Un tratamiento de IPA exitoso requiere, generalmente, una intervención quirúrgica y una terapia médica. La toma de decisiones en el tratamiento de IPA suele ser compleja y es necesario un enfoque multidisciplinario que incluya cirujanos ortopédicos, especialistas en enfermedades infecciosas, cirujanos plásticos y

microbiólogos <sup>13,93</sup>. Una mala decisión puede poner en peligro la vida y causar una discapacidad considerable al paciente, por eso es importante la elección del tratamiento. Los principales objetivos del tratamiento de IPA son erradicar la infección, restaurar la función de la articulación afectada, eliminar o reducir el dolor y minimizar la morbilidad o mortalidad del paciente <sup>13</sup>.

En general, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano empírico, es importante reducir la carga bacteriana eliminando todo el tejido infectado o disminuir la carga del *biofilm*. Se realiza mediante estrategias médicas como <sup>13,15</sup>:

- La supresión antimicrobiana sin cirugía.
- El desbridamiento quirúrgico sin extraer la prótesis, donde se elimina cualquier tejido necrótico o infectado.
- La resección de la prótesis, donde se separa total o parcialmente el tejido afectado.
- La artrodesis, en la cual se fija la articulación para dar soporte mecánico adicional.
- La amputación, que es exclusiva para pacientes a los que les han fallado el resto de opciones terapéuticas o presentan una infección potencialmente mortal.

La duración de los tratamientos antibióticos suelen ser de 4 a 6 semanas por vía intravenosa seguido de 3 a 12 meses de tratamientos orales, aunque puede variar según el caso <sup>13,15</sup>.

En las últimas décadas, el tratamiento de IPA se basó principalmente en inhibidores de la síntesis de la pared celular como penicilinas y glicopéptidos, sin embargo, los resultados no han sido exitosos. Una de las razones es la formación del *biofilm*, donde las bacterias resisten a los antibióticos más fácilmente. En la Tabla 15, se muestran diferentes recomendaciones de tratamiento de una IPA causada por estafilococos según varios estudios.

**Tabla 15.** Tratamiento de la IPA en estafilococos <sup>13,16,94,95</sup>.

Estudio	Sensibilidad antibiótica	Tratamiento de preferencia	Tratamiento alternativo	Duración
<b>Cheng Li et al.</b> <sup>94</sup>	MSSA/MSSE	Cefazolina Rifampicina	Levofloxacino Cotromoxazol Rifampicina+Doxiciclina	2 semanas
	MRSA/MRSE	Vancomicina Rifampicina	Levofloxacino Cotromoxazol Rifampicina+Doxiciclina	2 semanas
<b>Tande &amp; Patel</b> <sup>13</sup>	MSSA/MSSE	Cefazolina Nafcilina	Vancomicina Daptomicina Linezolid Rifampicina combinada	NI
	MRSA/MRSE	Vancomicina	Daptomicina Linezolid Rifampicina combinada	NI
<b>Osmon et al.</b> <sup>16</sup>	MSSA/MSSE	Nafcilina Cefazolina Ceftriaxona	Vancomicina Daptomicina Linezolid Rifampicina combinada	NI
	MRSA/MRSE	Vancomicina	Daptomicina Linezolid Rifampicina combinada	NI
<b>Ariza et al.</b> <sup>95</sup>	MSSA/MSSE	Cefazolina/Cloxacilina Daptomicina	Daptomicina+Fosfomicina	7-14 días
	MRSA/MRSE	Daptomicina+Cloxacilina o Fosfomicina	Daptomicina+Fosfomicina	7-14 días

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, MSSE: *Staphylococcus epidermidis* sensible a meticilina, MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, MRSE: *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina, NI: no indicado.

A continuación, se detallan algunas de las diferentes alternativas terapéuticas disponibles:

#### **1.4.1. Rifampicina**

Una terapia antimicrobiana óptima sería con rifampicina, ya que muestra una excelente eficacia contra los estafilococos en fase estacionaria y por su capacidad para penetrar bien en el hueso. Es recomendable la combinación de la rifampicina con otros antibióticos, incluidos fluoroquinolonas (ciprofloxacino), cotrimoxazol, ácido fusídico, clindamicina, doxiciclina y linezolid, porque presenta una alta probabilidad de generar resistencia en los casos en que se administre como monoterapia <sup>13,15,31,93,96</sup>.

#### **1.4.2. Fluoroquinolonas**

El uso de fluoroquinolonas, concretamente ciprofloxacino y levofloxacino, como tratamiento de la IPA ha dado buenos resultados por su capacidad de penetración en los huesos, de reducción del *biofilm*, su tolerabilidad, su biodisponibilidad y su actividad antimicrobiana <sup>31</sup>. A pesar de estas ventajas, es recomendable la combinación con rifampicina <sup>31,93</sup>.



### **1.4.3. Vancomicina**

El tratamiento de IPA debido a MRSE se recomienda con vancomicina. Sin embargo, aunque no es común aislar estafilococos resistentes a vancomicina, su uso puede llevar a la aparición de resistencias <sup>13,24,31</sup>.

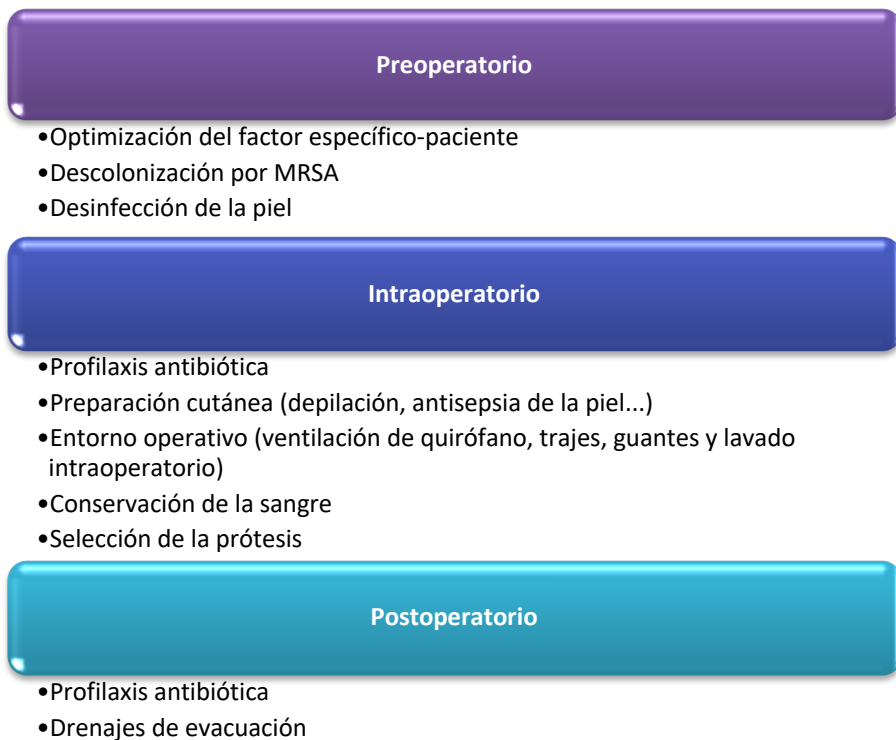
### **1.4.4. Daptomicina**

La daptomicina presenta una alta actividad bactericida en el crecimiento logarítmico y en la fase estacionaria en MRSE y es más efectiva con la adición de rifampicina, que en monoterapia <sup>13,93,96</sup>. Aún así, la vancomicina es el antibiótico intravenoso preferido para el tratamiento de IPA causado por MRSE <sup>13</sup>.

## **1.5. Profilaxis en infecciones protésicas**

Identificar y optimizar todos los factores de riesgo posibles antes de realizar una artroplastia articular es importante para prevenir el desarrollo de una IPA. Las estrategias generales para prevenir una IPA y evitar la contaminación son: dejar de fumar si el paciente es

fumador, controlar la glucosa en diabéticos, controlar otras infecciones, el lavado de manos, la descontaminación de la piel del paciente con antisépticos, y la profilaxis antimicrobiana, entre otras (Figura 11) <sup>4,13,43</sup>.



**Figura 11.** Medidas preventivas para las infecciones de prótesis articular. Adaptación de Kapadia *et al.* <sup>4</sup>.

Para combatir las infecciones del sitio quirúrgico, se implementó el uso de la profilaxis antibiótica perioperatoria, pudiendo reducir hasta un 80% el riesgo de infección <sup>13</sup>. La falta de un consenso repercute en que no haya una pauta definitiva de una profilaxis

óptima. La profilaxis antimicrobiana no solo depende del microorganismo, sino que también es importante el tiempo de administración del antibiótico <sup>5</sup>. Las pautas del Proyecto de Mejora de la Atención Quirúrgica recomiendan aplicar los antibióticos una hora antes de la cirugía para obtener menores tasas de infección <sup>97</sup>. Además, es recomendable el uso de una sola dosis a corto plazo de antibióticos para reducir los costos, la toxicidad farmacológica y el desarrollo de resistencias antimicrobianas <sup>4</sup>.

De acuerdo con el Comité Asesor del Proyecto de Mejora de la Atención Quirúrgica, la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos y las Guías de Práctica Clínica para la Profilaxis Antimicrobiana en Cirugía, la profilaxis antibiótica más efectiva para pacientes sometidos a un reemplazo de rodilla o cadera es cefazolina o cefuroxima <sup>4,5</sup>. El uso de cefalosporinas es comúnmente efectivo para bacterias grampositivas y gramnegativas <sup>13</sup>. Pero debido al incremento de especies resistentes a meticilina, se ha incrementado el uso de la combinación de cefazolina con otros antibióticos, como la vancomicina, gentamicina o la clindamicina. A los pacientes alérgicos a la penicilina, se les suele administrar vancomicina, además de los casos de resistencia a meticilina <sup>4,5</sup>.



## 2. Interés del estudio





Debido al incremento en el número de artroplastias realizadas en los últimos años, el aumento de la prevalencia de IPA, el impacto que tiene en los pacientes y el alto costo para los hospitales, hace que el estudio de estas infecciones sea de mayor interés.

La mayoría de las IPAs están causadas por los CoNS, siendo *S. epidermidis* el microorganismo encontrado con mayor frecuencia dentro de este grupo. *S. epidermidis* es una especie comensal importante en la microbiota nasal y cutánea humana que ha tenido un gran impacto clínico como patógeno oportunista en infecciones relacionadas con cuerpos extraños. Sin embargo, diferenciar entre un aislado de *S. epidermidis* que causa una infección verdadera o simplemente una contaminación, no resulta ser una tarea fácil.

Por la importancia de *S. epidermidis* en el microbioma de la piel humana y como patógeno implicado en diferentes tipos de infecciones, varios estudios se han focalizado en la búsqueda de marcadores genéticos que diferencien las cepas causantes de IPA de las cepas comensales. Hasta la fecha, no se ha identificado un marcador molecular único que discrimine las cepas causantes de IPA de las cepas comensales de *S. epidermidis*.

Por todas estas razones, nuestro principal objetivo es encontrar posibles marcadores genéticos para distinguir entre la población causante de la IPA y la población comensal de *S. epidermidis*. Esto

facilitaría el diagnóstico etiológico de las IPAs y podría orientar los tratamientos tanto empíricos como profilácticos.

Adicionalmente, en el presente trabajo hemos incluido una población de cepas totalmente novedosa: cepas aisladas del campo quirúrgico y que no han causado infección. Hasta donde sabemos, las cepas del campo quirúrgico no se han estudiado en este contexto ni se han comparado con las poblaciones de cepas de IPA y cepas comensales de individuos sanos. Este grupo de cepas se ha considerado bajo la posible hipótesis de ser consideradas como una población control, la cual es adecuada para discriminar entre cepas causantes de IPA y cepas comensales, debido a que se encuentra en el lugar de una posible entrada de contaminación, pero no es la causa de infección. Por lo tanto, pueden llegar a ser consideradas como un intermedio entre ambas poblaciones a comparar.





# 3. Objetivos





El principal objetivo del estudio es determinar diferencias entre cepas de *S. epidermidis* aisladas de pacientes con infección de prótesis articular, cepas aisladas de pacientes sanos y cepas aisladas en el campo quirúrgico de pacientes que se han sometido a una artroplastia primaria, mediante el estudio de la resistencia antimicrobiana, epidemiología y formación de *biofilm*.

### 3.1. Objetivos específicos

- Evaluar la sensibilidad antibiótica de las cepas de *S. epidermidis* frente a determinados antibióticos y comparar los resultados entre las tres poblaciones del estudio.
- Identificar la presencia de genes de resistencia a antibióticos en *S. epidermidis*.
- Determinar la diversidad clonal de las cepas de *S. epidermidis* mediante PFGE.
- Determinar la filogenia de las cepas de *S. epidermidis* mediante MLST.
- Determinar la formación fenotípica de *biofilm* en las cepas de *S. epidermidis* y comparar los resultados entre las tres poblaciones del estudio.
- Determinar la presencia de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles en las cepas de

*S. epidermidis* y comparar los resultados entre las tres poblaciones del estudio.

- Determinar la filogenia y la presencia de genes en las cepas ST2 de *S. epidermidis* mediante la técnica de secuenciación masiva del genoma (WGS).



# 4. Materiales y métodos







## 4.1. Cepas del estudio

Se analizaron un total de 117 cepas de *Staphylococcus epidermidis* pertenecientes a tres poblaciones diferentes:

- **IPA:** Infección de prótesis articular. Cepas aisladas de pacientes con infección de prótesis articular (n=50).
- **PS:** Personas sanas. Cepas comensales de muestra nasal y de piel de individuos sanos (n=50).
- **CQ:** Campo quirúrgico. Cepas aisladas del campo quirúrgico durante una artroplastia primaria (n=17).

Las cepas del grupo IPA se aislaron de pacientes con infección de prótesis articular de rodilla y de cadera durante el periodo 2013-2019; almacenadas en la colección de cepas de prótesis del Departamento de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Las cepas se identificaron con el número del caso y, según si se habían recogido varias cepas de un mismo paciente, se añadía una subcategoría. Se estudió una cepa por paciente excepto en los pacientes que se les había realizado intervenciones quirúrgicas en diferentes periodos de tiempo, o en pacientes con cepas que tenían diferente perfil antibiótico con la misma fecha de aislamiento. En esos casos se podían incluir 2 o 3 cepas por paciente.

Esta colección de cepas se conservaba en liófilos que fueron reconstituidos según se detalla más adelante.

Las cepas comensales fueron aisladas en individuos sanos, no relacionados con el ámbito hospitalario, ni sometidos a tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses previos a la recolección de las muestras. Las muestras se colectaron durante el periodo 2017-2018. A cada participante se le tomaron dos muestras, una nasal y otra cutánea. Si en ambas muestras se aislaba una cepa de *S. epidermidis* y presentaban un antibiograma diferente, se seleccionaban ambas, mientras que en los casos de que el antibiograma fuese igual, se seleccionaba la cepa procedente de la muestra nasal.

El tercer grupo de cepas se aisló del campo quirúrgico durante una artroplastia primaria en pacientes derivados del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y del Hospital del Mar, durante el periodo 2016-2019. Estas cepas fueron colectadas como parte del proyecto FIS “Optimización de la profilaxis quirúrgica antimicrobiana en los pacientes a los que se implanta una prótesis articular electiva en España” (IP: Dra. Natividad de Benito, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau), y se incluyeron en el presente trabajo de Tesis como grupo control.

Las prótesis implantadas a los pacientes fueron de rodilla o de cadera y se extraían 5 muestras por paciente. Después de un seguimiento de mínimo 1 año, ninguna de estas cepas ha causado

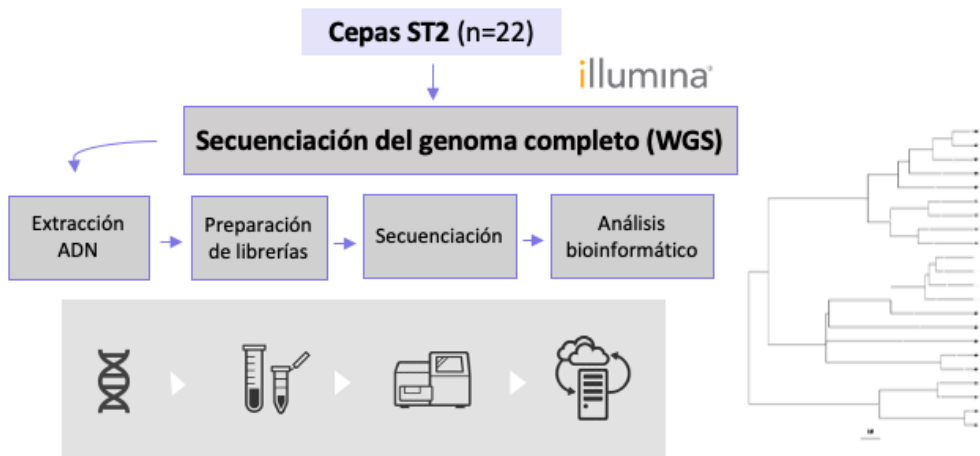
una IPA. En este grupo de cepas, se incluyó una por paciente excepto, en el caso que el antibiograma fuera diferente entre dos cepas del mismo paciente, pero de muestras diferentes, se incluyeron dos cepas por paciente.

Cabe destacar que la inclusión de esta última población de cepas tiene una especial importancia ya que no ha sido estudiada ni comparada con las otras dos poblaciones en otros estudios. Además, podría ser el verdadero grupo control del estudio, porque son cepas que estaban presentes en el campo quirúrgico, justo en el momento de la implantación de la prótesis, y no han sido las responsables de una IPA.

La metodología seguida en este estudio se indica en la Figura 12. Adicionalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó un estudio complementario de secuenciación del genoma completo (WGS) de las cepas ST2 (Figura 13).



Figura 12. Esquema de la metodología realizada en este estudio.



**Figura 13.** Esquema de la metodología realizada en las cepas ST2.

## 4.2. Aislamiento e identificación

El aislamiento de las cepas de *S. epidermidis* se realizó de una manera diferente para cada uno de los 3 grupos de cepas, anteriormente descritos.

- Las cepas de infección (**IPA**), como se encontraban liofilizadas, se resuspendieron en 1 ml de medio de caldo tripticasa de soja (CT) y se incubaron 30 min a 37°C. Posteriormente, se realizó una siembra en Agar Sangre (BioMérieux®, Francia), y se incubaron durante 24 h a 37°C, para la posterior identificación por MALDI-TOF y conservación en medio de conservación, que se explica más adelante.

- Para el aislamiento de las cepas comensales (**PS**), las muestras nasales y cutáneas se recogieron con hisopos humedecidos con suero fisiológico frotando las fosas nasales, para la muestra nasal, y otro para la zona del antebrazo y muñeca, para la muestra cutánea. Posteriormente este hisopo fue utilizado para realizar la siembra en el medio de cultivo Chapman o Agar manitol sal (BioMériux®, Francia), un medio diferencial que inhibe bacterias gramnegativas. A partir de las colonias crecidas a las 24 h a 37 °C, se seleccionaron los estafilococos coagulasa negativos (CoNS), identificados como las colonias rojas o ligeramente rosadas, incapaces de fermentar el manitol. En el caso de que fermenten el manitol del medio, se produce un cambio de color tornándose amarillo. Las colonias amarillentas se identifican como probables *S. aureus* u otros estafilococos fermentadores de manitol (no *S. epidermidis*) y no se incluyen en el estudio. Las colonias seleccionadas se cultivaron en Agar Sangre a 37 °C durante 24 h y se realizó la posterior identificación por MALDI-TOF. A partir de estos resultados, se seleccionaron las cepas de *S. epidermidis*.

- Las cepas del campo quirúrgico (**CQ**), se obtuvieron a partir del procesamiento de cinco muestras obtenidas tras el implante de una prótesis y antes del cierre de la incisión en un paciente. En el caso de la implantación de una prótesis de rodilla, se extrajeron dos muestras de tejido alrededor del fémur, dos de tejido alrededor de la tibia y una de tejido subcutáneo. Y en las artroplastias de cadera,

se recogieron dos muestras del tejido periacetabular, dos del tejido alrededor del fémur y una del tejido subcutáneo. Las muestras se trituraron en un mortero con 1 ml de suero fisiológico, se sembraron en Agar Sangre, Agar Chocolate y Agar Sangre para anaerobios (BioMériux®, Francia) y se revisaron a las 48 h y a los 7 días de incubación. Las colonias crecidas se sembraron en el mismo medio que habían crecido y, tras la identificación por MALDI-TOF, se seleccionaron las cepas de *S. epidermidis*.

La identificación mediante el sistema MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) (Bruker Daltonics, Estados Unidos) se basa en la utilización de espectrometría de masas para identificar microorganismos mediante el análisis de proteínas. La creación de un espectro de masas específico permite identificar a nivel de género y especie cada microorganismo. El espectrómetro de masas está compuesto por <sup>98</sup>:

- Una fuente ionizante que transfiere iones a las moléculas de la muestra.
- Un analizador de masas que separa los iones según su relación masa/carga.
- Un dispositivo de detección para controlar los iones separados.

El procedimiento empleado se detalla a continuación y se muestra en la Figura 14:

1. Se parte de una pequeña porción de una colonia crecida en medio Agar Sangre (cultivo incubado a 37 °C *overnight*), el cual se deposita sobre la placa metálica de MALDI-TOF. En el caso de *S. epidermidis* y otros microorganismos cuya lisis es más complicada, se añade 1 µl de ácido fórmico puro sobre la porción de la colonia en la placa.
2. Tras el secado, se añade 1 µl de la matriz orgánica, encargada de absorber la luz láser. Después de este paso, se forma una cristalización de la muestra y la matriz, necesaria para la ionización de la muestra.
3. Posteriormente, se introduce la placa en el espectrómetro de masas donde se ionizan las moléculas por la aplicación de un láser, se aceleran por un campo electrostático y se expulsan a través de un tubo de vuelo hasta el detector.
4. Los iones se separan en función de su tamaño, creando así un espectro de masas con picos masa/carga ( $m/z$ ).
5. El espectro se compara con una base de datos y los resultados se dan en valor de puntuación o nivel de confianza, según la similitud del microorganismo con los espectros de referencia.

La identificación a nivel de especie se estableció con valor de puntuación de 2-3 y se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922 como control.



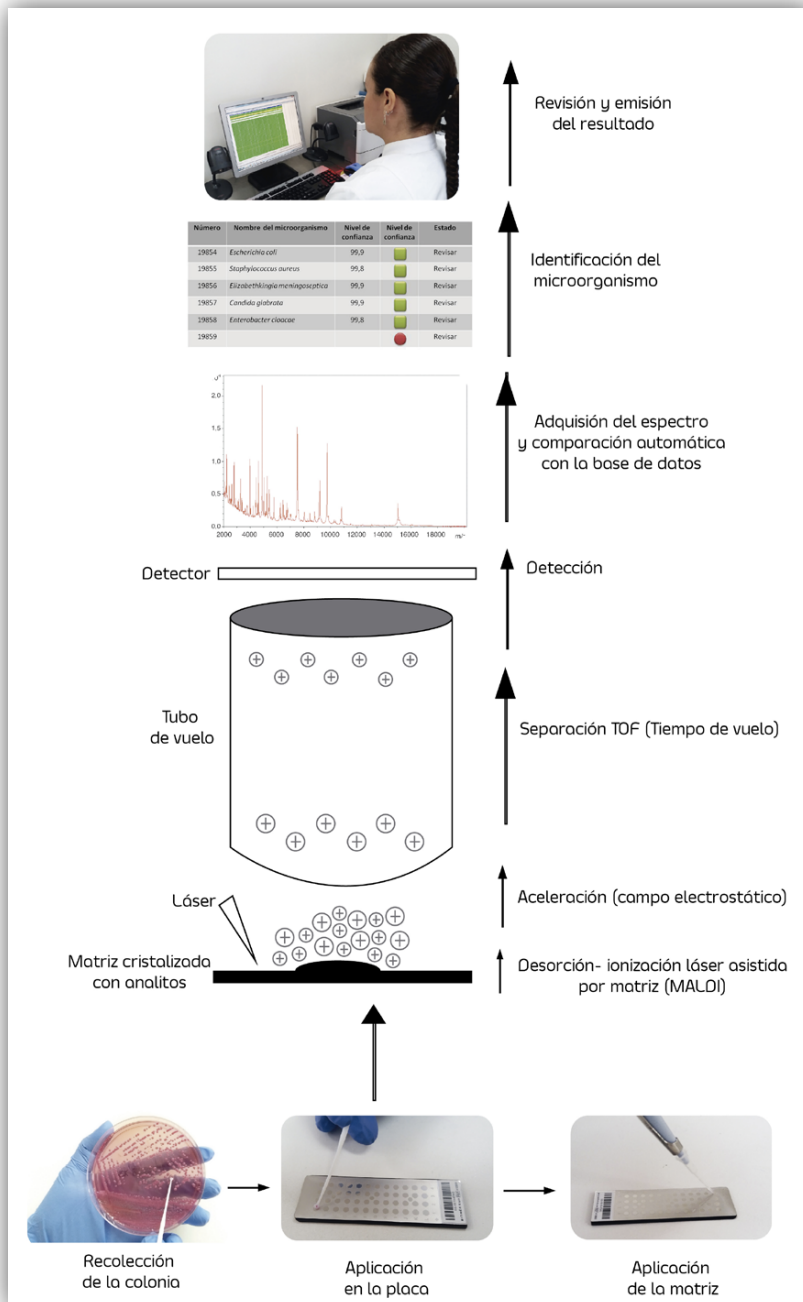


Figura 14. Esquema de la técnica de MALDI-TOF <sup>98</sup>.

La conservación de cepas de *S. epidermidis* se realizó por congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a partir de un cultivo puro de cada cepa. Para ello, se recoge todo el cultivo de una placa de Agar Sangre con un asa de siembra y se introduce en un criotubo con medio de congelación, el cual se prepara a partir de una solución de 30 g de caldo tripticasa de soja, 200 ml de glicerol y 1 L de agua destilada. Se congela el tubo con el contenido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3. Estudio de la sensibilidad antibiótica**

#### **4.3.1. Técnica de disco difusión**

El estudio inicial de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas se realizó mediante la técnica de disco difusión. Esto permitió discriminar entre cepas del mismo paciente/participante:

- Si presentaban el mismo perfil de sensibilidad a antibióticos, solo se incluía una de las cepas en el estudio, en el caso de las cepas comensales y de campo quirúrgico. En el grupo de cepas de IPA podían incluirse dos cepas con el mismo antibiograma si habían sido recogidas en diferentes intervenciones quirúrgicas.

Se utilizó la técnica de disco difusión por su coste y simplicidad en comparación con la técnica de microdilución, con el fin de comparar el perfil de sensibilidad entre cepas.

La técnica de disco difusión está basada en exponer el microorganismo inoculado en una superficie de placa de agar, a una cantidad determinada de antibiótico. El antibiótico se encuentra en discos y difunde radialmente a través del agar formándose así un gradiente de concentración. El microorganismo inoculado en la placa agar crecerá hasta donde la concentración del antibiótico inhiba su crecimiento, formándose un halo de inhibición. Los diámetros de inhibición se correlacionan inversamente con la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El procedimiento se detalla a continuación:

1. Sembrar en Agar Sangre e incubar a 37 °C *overnight* (18-24 h).
2. Seleccionar varias colonias aisladas de la placa de Agar Sangre.
3. Hacer suspensión en 2 ml de solución salina y ajustar el inóculo a 0,5 Mc Farland con el nefelómetro Thermo Scientific™ Sensititre™ Nephelometer (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

4. Inocular la suspensión bacteriana en las placas de Agar Mueller-Hinton (bioMérieux, Estados Unidos) de manera uniforme sin dejar ninguna zona libre. El escobillón se desliza sobre la superficie del agar formando estrías paralelas hasta que cubra toda la placa.
5. Dispensar discos de antibióticos sobre la placa, incluyendo cefoxitina, penicilina, oxacilina, linezolid, eritromicina, clindamicina, vancomicina, teicoplanina, rifampicina, mupirocina, ciprofloxacino, cotrimoxazol, ácido fusídico, gentamicina, tobramicina y doxicilina.
6. Incubar a 37 °C durante 18-24 h.
7. Medir con SirScan 2000 automático (i2a, Francia) los halos de inhibición que se interpretan según los puntos de corte establecidos por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos, en inglés *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)). Los resultados se expresan en las categorías sensible, intermedio o resistente.

Los antibióticos evaluados y su posición en el antibiograma se indican en la Tabla 16 y la Figura 15.

**Tabla 16.** Siglas y posición de los antibióticos evaluados mediante disco difusión.

Posición	Antibiótico	Siglas
1	Cefoxitina	FOX30
2	Penicilina	P1
3	Oxacilina	OX1
4	Linezolid	LNZ10
5	Eritromicina	ERY15
6	Clindamicina	DA2
7	Vancomicina	VA5
8	Teicoplanina	TEC30
9	Rifampicina	RA5
10	Mupirocina	MUP200
11	Ciprofloxacino	CIP5
12	Cotrimoxazol	SXT25
13	Ácido Fusídico	FA10
14	Gentamicina	CN10
15	Tobramicina	TOB10
16	Doxiciclina	DOX30

1	2	3	4
FOX30	P1	OX1	LNZ10
5	6	7	8
ERY15	DA2	VA5	TEC30
9	10	11	12
RA5	MUP200	CIP5	SXT25
13	14	15	16
FA10	CN10	TOB10	DOX30



**Figura 15.** Panel de antibiograma para estafilococos en la técnica disco difusión según el laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

#### 4.3.2. Técnica de microdilución

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antimicrobianos frente a *S. epidermidis* mediante microdilución. La CMI se define como la mínima concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo.

Aclarar que, la técnica de disco difusión, más barata y rápida, se utilizó para la diferenciación de cepas del mismo paciente/participante, lo que incluye un volumen de cepas mayor dado que se evaluaron cepas que finalmente no se incluyeron en la colección. En cambio, la técnica de microdilución fue aplicada solamente en las cepas incluidas en el estudio, por su alto coste.

El análisis de la sensibilidad antibiótica se realizó por la técnica de microdilución mediante placas de microtitulación de Sensititre ESTEN2F (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

El procedimiento empleado es el siguiente:

1. Obtener un cultivo fresco en Agar Sangre (37 ° C, 24 h).
2. Efectuar una suspensión a partir del cultivo puro en 4 ml de solución salina. Ajustar el inóculo a 0,5 McFarland con el nefelómetro Thermo Scientific™ Sensititre™ Nephelometer (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), con una concentración final de  $5 \times 10^5$  CFU/ml.

3. Transferir 50 µl en el medio de cultivo Caldo Mueller-Hinton Cationes (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (dilución 1:100).
4. Agitar el tubo en el vórtex.
5. Sustituir el tapón del tubo por el cabezal dosificador Sensititre.
6. Colocar el tubo en el inoculador automático Thermo Scientific™ Sensititre AIM™ Automated Inoculation Delivery System (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), el cual permite dispensar automáticamente inóculos en múltiples de 50 µl en una placa de microtitulación Sensititre de 96 pocillos.
7. Tapar la placa con una lámina adhesiva para evitar la evaporación, e incubar a 37 °C durante 18-24 horas.
8. Examinar placas con el visor manual Thermo Scientific™ Sensititre™ Manual Viewer (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para observar el crecimiento bacteriano.

La interpretación de los resultados se basó en los criterios para *S. epidermidis* de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) del 2017 <sup>99</sup>, excepto para tigeciclina (TIG), ácido fusídico (FUS) y fosfomicina (FOS), que se interpretaron de acuerdo con los criterios de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) del 2017 <sup>100</sup>. Los antibióticos evaluados fueron penicilina (PEN), vancomicina (VAN), rifampicina (RIF), eritromicina (ERY),

clindamicina (CLI), linezolid (LZD), teicoplanina (TEI), oxacilina (OXA), daptomicina (DAP), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TET), trimetoprim-sulfametoxazol/cotrimoxazol (SXT/COT), gentamicina (GEN) (Tabla 17). El fenotipo de multirresistencia (MDR) se definió cuando una cepa era resistente a tres o más familias de antibióticos

101.

**Tabla 17.** Puntos de corte de los antibióticos evaluados en *S. epidermidis*.

Antibiótico	Abreviación	Punto de corte CMI (mg/l)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
<b>Tigeciclina</b>	TIG	> 0.5	-	≤ 0.5
<b>Ácido Fusídico</b>	FUS	> 1		≤ 1
<b>Fosfomicina</b>	FOS	> 32	-	≤ 32
<b>Penicilina</b>	PEN	≥ 0.25	-	≤ 0.12
<b>Vancomicina</b>	VAN	≥ 16	8-16	≤ 4
<b>Rifampicina</b>	RIF	≥ 4	2	≤ 1
<b>Eritromicina</b>	ERY	≥ 8	1-4	≤ 0.5
<b>Clindamicina</b>	CLI	≥ 4	1-2	≤ 0.5
<b>Linezolid</b>	LIN	≥ 8	-	≤ 4
<b>Teicoplanina</b>	TEI	≥ 32	16	≤ 8
<b>Oxacilina</b>	OXA	≥ 0.5	-	≤ 0.25
<b>Daptomicina</b>	DAP	-	-	≤ 1
<b>Ciprofloxacino</b>	CIP	≥ 4	2	≤ 1
<b>Tetraciclina</b>	TET	≥ 16	8	≤ 4
<b>Cotrimoxazol</b>	COT	≥ 4/76	-	≤ 2/38
<b>Gentamicina</b>	GEN	≥ 16	8	≤ 4



## 4.4. Extracción del ADN genómico

Para la realización de la técnica de PCR, que se explicará posteriormente (Ver más en el apartado “Reacción en cadena de la Polimerasa”), se llevó a cabo la extracción genómica del ADN mediante el kit *Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante (Figura 16):

### 1. Cultivo bacteriano

- Sembrar las cepas en Agar Sangre e incubar a 37 °C *overnight*.
- Seleccionar 1-2 colonias, inocular en medio caldo tripticosa (CT) e incubar a 37 °C *overnight*.
- Introducir 1,5 ml en tubo *ependorf* de 2 ml.
- Centrifugar a 12.000-16.000 xg durante 2 min.
- Descartar medio.

### 2. Digestión de la pared celular

- Resuspender el pellet en 200 µl de solución de lisozima (hasta que quede homogéneo y pocas burbujas).

Nota: la solución mencionada se describe más adelante.

- Añadir 20 µl RNAsa y dejar durante 2 min.
- Incubar en el baño de 37°C durante 30 min.
- Descongelar a temperatura ambiente la Proteinasa K y Solución de Lisis.

### 3. Lisis celular

- Añadir 20 µl de Proteinasa K.
- Añadir 200 µl de Solución Lisis C.
- Añadir 2 perlitas (para mejorar la lisis).
- Vórtex e incubar en el baño de 55°C durante 10 min.

### 4. Preparación columna

- Añadir 500 µl de Solución de Preparación de la columna a un tubo nuevo.
- Centrifugar a 12.000 xg durante 1 min.
- Descartar líquido.

### 5. Unión de ADN en columna

- Añadir 200 µl de etanol y vórtex.
- Transferir mezcla a columna.
- Centrifugar a 6500 xg durante 1 min.

### 6. Limpieza de la columna

- Transferir columna a un tubo nuevo.
- Añadir 500 µl de Solución de Lavado 1.
- Centrifugar a 6500 xg durante 1 min.
- Añadir 500 µl de Solución de Lavado Concentrada.
- Centrifugar a 12.000 xg durante 3 min.

### 7. Elución ADN

- Transferir columna a un tubo nuevo.
- Añadir 150 µl de Solución de Elución.

- Centrifugar a 6500 xg durante 1 min.
- Dejar a temperatura ambiente durante 2 min.
- Quitar columna.

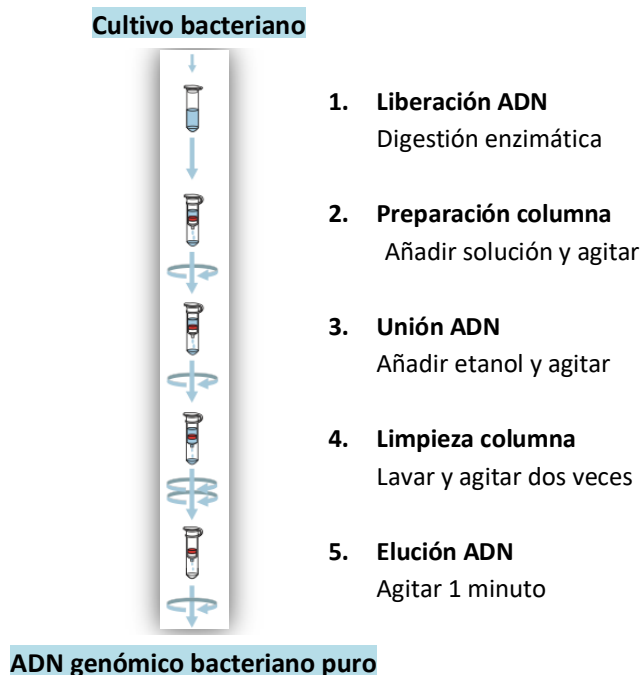
### Preparación de soluciones

- Cálculos solución lisozima:

$N^{\circ}$  reacciones  $\times$  0,2 ml por muestra = ml buffer (VF)

$$\frac{45 \text{ mg} \times VF}{1 \text{ ml}} = \text{mg lisozima}$$

$$VF \times \frac{200 \text{ unid}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ ml}}{13500 \text{ unid}} = V_{\text{lisostafina}}$$



**Figura 16.** Esquema de la metodología de extracción de ADN mediante el kit *Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich).

La cuantificación de la concentración del ADN obtenido ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) y su pureza (relación 260/280) fueron determinados por el espectrofotómetro Epoch de microplaca (BioTek™, Estados Unidos) y el software *Gen5* (BioTek™, Estados Unidos).

1. Se añade  $1 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril como blanco y, a continuación,  $1 \mu\text{l}$  de las muestras de ADN extraído en la placa Epoch (Figura 17).

2. Se introduce la placa en el espectrofotómetro Epoch (Figura 18) y se procede a la lectura en el software *Gen5*.
3. El conjunto de resultados se muestra en una tabla de Excel con los valores de concentración de ADN (ng/μl) y la relación 260/280 (Figura 19).

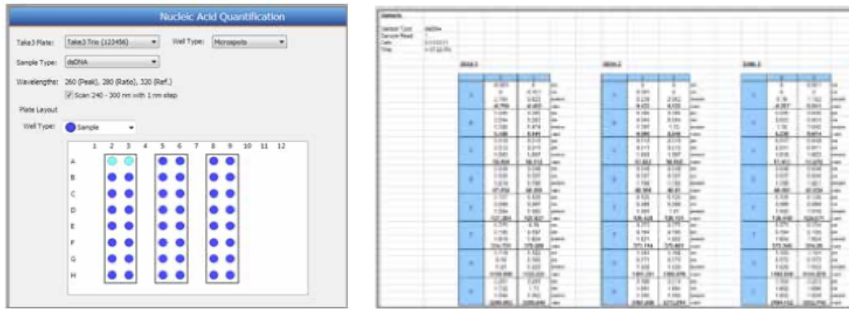
Se consideró una extracción de ADN correcta con valores de concentración de ADN mayores a 20 ng/μl y valores de la relación 260/280 entre 1,8-2, obteniendo así un ADN con una pureza óptima.



**Figura 17.** Placa Epoch (Biotek).



**Figura 18.** Espectrofotómetro Epoch (BioTek).



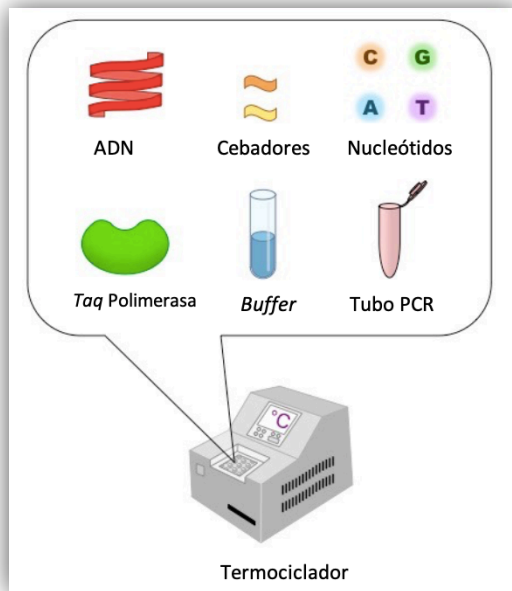
**Figura 19.** Cuantificación de ácidos nucleicos en el software *Gen5* (Biotek). Se muestra el blanco y las muestras (izquierda) y la tabla de resultados (derecha).

## 4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de Polimerasa, en inglés *Polymerase Chain Reaction* (PCR), es una técnica que permite amplificar pequeñas regiones específicas del ADN *in vitro*. Para desarrollarse se requiere (Figura 20):

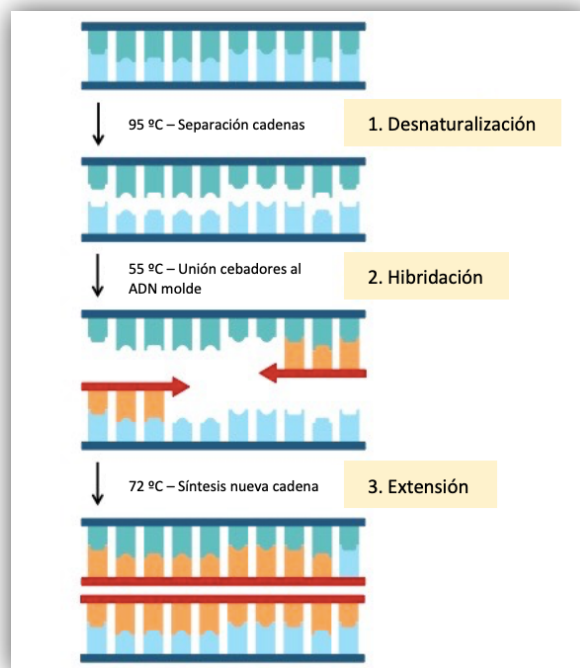
- Dos cebadores específicos u oligonucleótidos de ADN, en inglés *primers*, que flanquean el fragmento de ADN de interés.
- La *Taq* Polimerasa, la enzima que se encarga de sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de la cadena molde.
- El ADN molde, el que nos interesa amplificar.

- Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP y dTTP), a partir de los cuales se sintetiza el nuevo ADN.
- Iones divalentes y monovalentes, como el magnesio y el potasio, respectivamente.
- Una solución tampón, en inglés *buffer*, para mantener el pH.
- El termociclador, es el equipo encargado de mantener la temperatura y llevar a cabo las condiciones de cada etapa de los ciclos repetidos.



**Figura 20.** Componentes principales de la PCR.

Las tres etapas de una PCR son: (1) desnaturalización, (2) hibridación y (3) extensión (Figura 21). En la primera etapa se produce una desnaturalización térmica (94 °C) del ADN bicatenario a monocatenario. En la segunda etapa se lleva a cabo la unión entre los cebadores y el ADN molde para iniciar la síntesis de la cadena complementaria, a unos 55 °C. Por último, en la tercera etapa comienza la extensión desde los extremos 3' de los cebadores por la *Taq* Polimerasa hasta que se sintetizan las dos cadenas monocatenarias, a unos 72 °C.



**Figura 21.** Etapas de la PCR.



En nuestro estudio se ha utilizado NZYTaQ II 2x Green Master Mix (nzytech, Portugal) para la detección de genes específicos por PCR y su posterior secuenciación. La mezcla (Mix) incluye la ADN polimerasa, dNTPs, buffer de reacción y aditivos a concentraciones óptimas, es decir, solo se ha de añadir los cebadores, el agua y el ADN extraído (Tabla 18).

El procedimiento de amplificación mediante PCR incluye las siguientes etapas:

1. Descongelar NZYTaQ II 2x Green Master Mix (nzytech, Portugal), el agua destilada estéril (B. Braun, Alemania) y los cebadores.
2. Rotular los tubos *ependorf* de 200  $\mu$ l con su respectiva identificación.
3. Preparar los cebadores (*forward* y *reverse*) específicos para cada gen, a una concentración de 10 mM a partir de una solución madre de 100 mM.
4. Preparar la mezcla de reacción única. Se compone de la combinación de los reactivos indicados en la Tabla 18, con sus respectivas cantidades. Las PCRs se realizaron a volumen final de 50  $\mu$ l.
5. Colocar los tubos en el termociclador.

6. Introducir los parámetros en el termociclador con las fases, temperatura, tiempo y número de ciclos de la reacción de PCR según el gen que queramos amplificar.
7. Una vez acabado el programa del termociclador, guardar los tubos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 18.** Contenido de la mezcla de reacción de la PCR.

Reactivo	Volumen por muestra ( $\mu\text{l}$ )
Agua	19
Master Mix*	25
Cebador F	2
Cebador R	2
ADN	2

\* NZYtaq II 2x Green Master Mix contiene ADN polimerasa, dNTPs, buffer de reacción y aditivos a concentraciones óptimas. Concentración de la enzima:  $0,2\text{ U}/\mu\text{l}$ . Concentración de  $\text{MgCl}_2$ :  $2,5\text{ mM}$ .

Los genes detectados en este estudio mediante PCR se indican en la Tabla 21 y Tabla 23, junto con las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR utilizadas.

## 4.6. Electroforesis en gel de agarosa

La visualización del tamaño de los amplificadores obtenidos en la PCR se realiza por electroforesis en gel de agarosa en el rango de 1-2 %. El gel de agarosa se compone por la agarosa SeaKem® Gold Agarose (Lonza, Suiza), tampón TBE 0,5X (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) y GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal). Se utilizó como marcador de peso molecular el ADN *Molecular weight VIII* (Roche®, Suiza), con pesos de entre 67-1117 pb.

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Añadir en el recipiente la cantidad de TBE 0,5X (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) estimada según el tamaño y la concentración del gel.
2. Pesar la agarosa SeaKem® Gold Agarose (Lonza, Suiza) e introducir en el recipiente con el TBE 0,5X.
3. Calentar en microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente en el TBE 0,5X y que no se observen pequeñas partículas flotantes.
4. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente.
5. Colocar los peines de plástico para crear los pocillos en el molde de electroforesis.

6. Añadir 3  $\mu$ l de GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal) por cada 100 ml de TBE 0,5X, mezclar generosamente y verter en el molde de electroforesis.
7. Cuando el gel esté solidificado, introducir en la cubeta de electroforesis y adicionar el buffer TBE 0,5X hasta que el gel quedé cubierto.
8. Añadir 10  $\mu$ l del amplificado obtenido de la PCR en el pocillo del gel.
9. Al final de cada fila del gel añadir 10  $\mu$ l de marcador de peso molecular ADN *Molecular weight* VIII.
10. Aplicar voltajes entre 100-110 V a un amperaje de 30-40 mA.
11. Visualizar gel en el transiluminador de luz UV G:BOX F3 (Syngene, Reino Unido), para detectar las bandas y realizar una fotografía. Si se observa la banda en la altura correspondiente al tamaño específico del gen, significará que ese gen está presente en esa cepa determinada.

Preparación de soluciones:

- Tampón TBE 0,5X:  
1 L  $\rightarrow$  50 ml TBE 10X y enrasar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O
- Tampón TBE 10X:

1 L → 121,5g Trizma + 0,745g EDTA + 61,8g ácido bórico  
+ enrasar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O

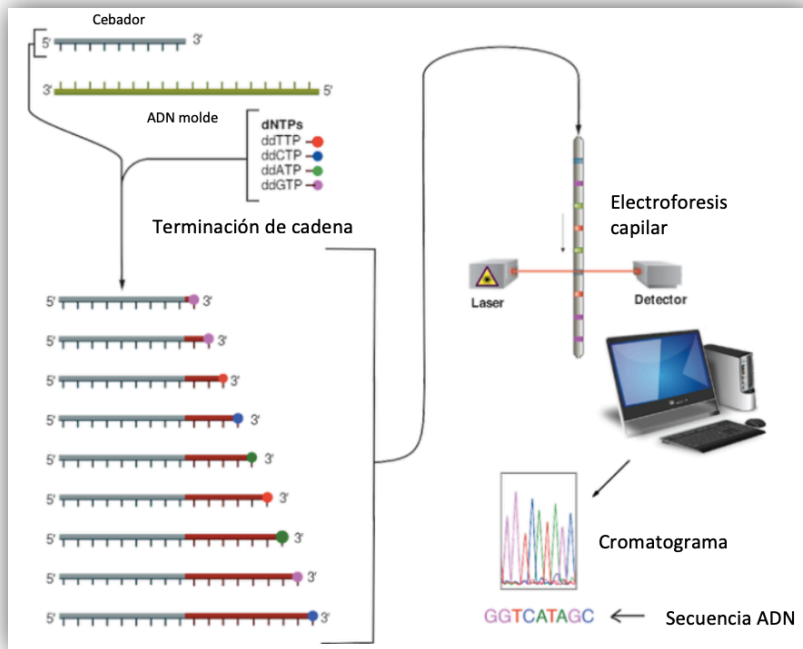
## 4.7. Purificación

Previamente a la secuenciación, los productos de PCR deben purificarse. En nuestro laboratorio se utiliza el reactivo PureIT ExoZAP (AMPLIQON, Dinamarca) que elimina posibles interferentes. Para los 10 µl del amplificado necesarios para la secuenciación, se añaden 4 µl del reactivo y se somete a un tratamiento térmico de 37°C durante 5 minutos y 80°C durante 10 minutos.

## 4.8. Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger es la secuenciación convencional donde se determina la secuencia de bases nucleotídicas (A, T, C y G) de un fragmento de ADN de interés. Se basa en una modificación de la técnica de PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia y una electroforesis capilar. Los nucleótidos dideoxi actúan como terminadores de cadena mediante el marcaje de los extremos del fragmento, determinando así la secuencia.

Similar a la PCR, la muestra de ADN se combina con el cebador, la ADN polimerasa, los nucleótidos de ADN, y los nucleótidos dideoxi fluorescentes. Se desnaturaliza el ADN molde, se separan las cadenas, el cebador se une al ADN molde y la ADN polimerasa sintetiza el ADN nuevo a partir del cebador. La ADN polimerasa añade nucleótidos a la cadena hasta que se agregue un nucleótido dideoxi, el cual impide agregar más nucleótidos y la cadena termina. Es decir, los extremos de los fragmentos obtenidos tendrán el nucleótido final marcado de un color. Una vez realizados todos los ciclos, se lleva a cabo la electroforesis capilar en gel. Los fragmentos generados se mueven a través de los poros del gel según su tamaño y mediante un láser se detecta el color de la fluorescencia del nucleótido. El conjunto de nucleótidos detectados forma la secuencia del fragmento de ADN que consiste en una serie de picos según la intensidad de la fluorescencia detectada, conocido como cromatograma (Figura 22).



**Figura 22.** Esquema de la secuenciación Sanger.

A diferencia de la secuenciación del genoma completo (WGS), que se explicará más adelante, la secuenciación Sanger está limitada a detectar sustituciones y pequeñas inserciones y deleciones.

La plataforma utilizada fue Macrogen Spain (Madrid, España) (<https://dna.macrogen.com>).

## **4.9. Análisis de las secuencias**

Los datos obtenidos en la secuenciación fueron analizados mediante el software Bionumerics v7.6 (Applied Maths, Bélgica). En nuestro estudio, se secuenciaron y analizaron los genes de MLST y el gen *agr* para su tipificación. El análisis de sus secuencias se explicará en su respectivo apartado.

## **4.10. Estudios de Epidemiología Molecular Por Macrorestricción Genómica y Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)**

Para poder comparar cepas del mismo paciente y/o de varios pacientes se realizaron estudios de macrorestricción genómica y Electroforesis en Gel de Campo Pulsado, en inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). El objetivo de esta técnica es evaluar la relación epidemiológica basada en comparaciones del cromosoma por la separación de fragmentos largos del ADN y el cálculo de su tamaño. La separación de cada fragmento de ADN se produce por



los impulsos eléctricos que hacen migrar los fragmentos a diferente velocidad, según su peso molecular.

La enzima *SmaI* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) se usó para la restricción genómica de las cepas de *S. epidermidis* siguiendo el procedimiento descrito por Goering & Fey<sup>102</sup>.

El procedimiento se detalla a continuación:

1. Cultivar las cepas en Agar Sangre e incubar a 37°C *overnight*.
2. Ajustar con buffer TEN a una densidad óptica OD<sub>540nm</sub> de 1,0 mediante el espectrofotómetro SmartSpec™ Plus Spectrophotometer (Bio-Rad®, Estados Unidos).
3. Preparar agarosa/EC al 2%: añadir agarosa a EC y disolver hasta que quede transparente.

Nota: las soluciones mencionadas se describen más adelante.

4. Calentar la agarosa a 55°C en el termobloque para que no se solidifique.
5. Introducir 1 ml de suspensión bacteriana en tubos *ependorf* de 1,5 ml y centrifugar a 14.000 xg durante 20 segundos.
6. Eliminar sobrenadante y resuspender pellet en 200µl de EC. Guardar a 55°C.

7. Preparar los moldes para la formación de los insertos (pegar los moldes en una superficie con celo).
8. Cerca de la zona del termobloque, añadir 200µl de agarosa/EC, seguidamente 60 µl de solución de lisostafina, mezclar con vórtex e introducir la mezcla en moldes para formar los insertos. Dejar solidificar 30 min a 4 °C.
9. Una vez solidificados, colocar los insertos en tubos con 5 ml de EC. Incubar en baño de 37°C durante 1h.
10. Lavados: Reemplazar EC por 5 ml de TE precalentado a 55°C e incubar en el baño de 55°C 30 min con agitación. Repetir proceso y guardar a 4°C.
11. Digestión: Introducir 1/3 del inserto cortado con un portaobjetos en un *eppendorf* de 2 ml. El inserto restante se guarda en otro *eppendorf*. Añadir 200 µl de MIX a cada inserto y 4-5 µl de enzima *SmaI*. Incubar a temperatura ambiente durante 2h.
12. Preparar *buffer* TBE 0,5X (VF=2,5 l): Primero montar el soporte del gel y luego el *buffer*. Cuando está preparado 1 l de *buffer*, se vacía la cubeta (sin bomba), se añade el litro de *buffer* y cuando el refrigerante se encuentre a 14°C, añadir 1,3 l de *buffer* a la cubeta de electroforesis. Los 200 µl

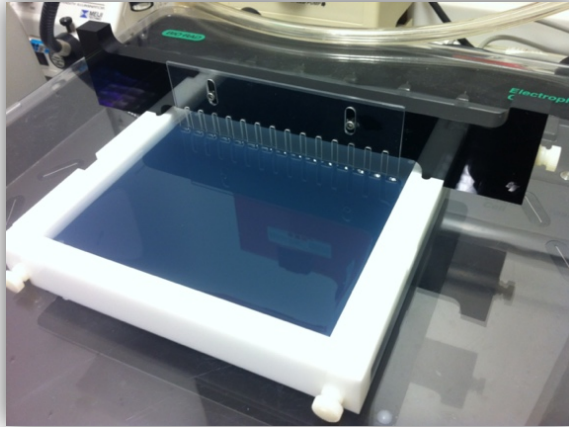
restantes de TBE 0,5X se utilizan para la preparación del gel (pesar 2 g de agarosa en 200  $\mu$ l de TBE 0,5X).

13. Transferir insertos al peine y quitar exceso de líquido cuidadosamente, empleando papel absorbente. Poner marcador de peso molecular Lambda Ladder (Bio-Rad®, Estados Unidos) en los extremos y en el centro del peine. Añadir la agarosa y dejar solidificar 30 min a temperatura ambiente (Figura 23). Quitar soportes.
14. Transferir el gel de agarosa a la cámara de electroforesis de campo pulsado CHEF-DR III® (Bio-Rad®, Estados Unidos) (Figura 24). Condiciones: 6 V/cm, 120° (ángulo reorientación), 14 °C. Tiempo de electroforesis: 23 h totales en 2 bloques de 5 a 15 s durante 10 h seguido de 15–60 s durante 13 h.
15. Retirar el gel de la cámara de electroforesis y teñir con 40  $\mu$ l de Green Safe con agitación suave durante 20-30 min.
16. Desteñir gel en agua destilada durante 30-45 min.
17. Capturar la imagen del gel con luz UV mediante el transiluminador G:BOX F3 (Syngene, Reino Unido) (Figura 25).

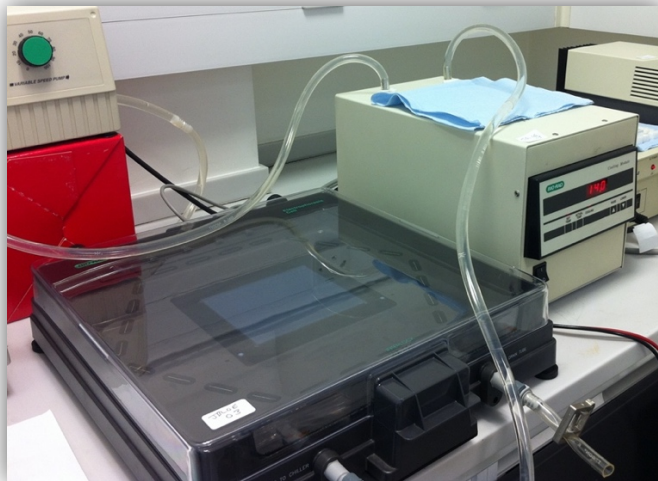
## Preparación de soluciones

- Cálculos agarosa/EC 2%:
  - $N^{\circ} \text{ de muestras} \times 200 \mu\text{l EC} = VF \text{ EC}$
  - $\frac{VF \text{ EC} \times 2g \text{ agarosa}}{100} = Xg \text{ agarosa}$
- Cálculos solución lisostafina:
  - $N^{\circ} \text{ de muestras} \times 60 \mu\text{l lisostafina} = VF$
  - $15 \frac{mg}{ml} \times V_{\text{lisostafina}} = 0,5 \times VF$
  - $VF - V_{\text{lisostafina}} = V_{\text{acetato}}$
- Cálculos acetato:
  - $75 \times V_{\text{acetato sol madre}} = 20 \times VF$
  - $VF - V_{\text{acetato sol madre}} = H_2O$
- Cálculos MIX digestión:
  - $N^{\circ} \text{ de muestras} \times 200 \mu\text{l buffer} = VF$
  - $10 \times V_{\text{buffer}} = 1 \times VF$
  - $VF - V_{\text{buffer}} = H_2O$
- Cálculos TBE 0,5X:

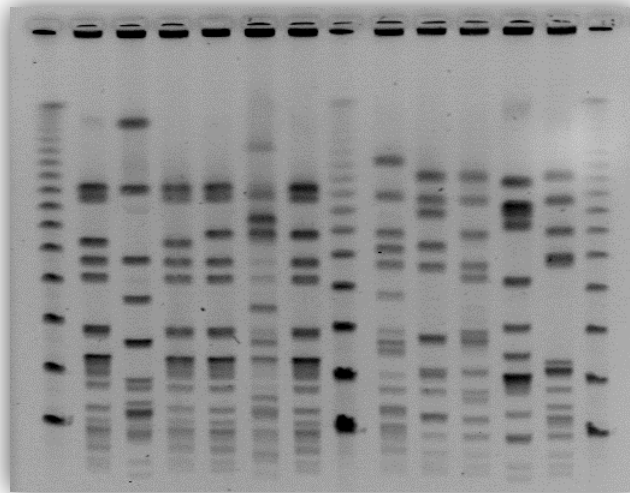
- 1 L → 50 ml TBE 10X y enrasar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O
- 0,5 L → 25 ml TBE 10X y enrasar a 500 ml con H<sub>2</sub>O



**Figura 23.** Elementos para la realización de PFGE. Concretamente, soporte y peine de CHEF-DR III (Bio-Rad) y gel de agarosa.

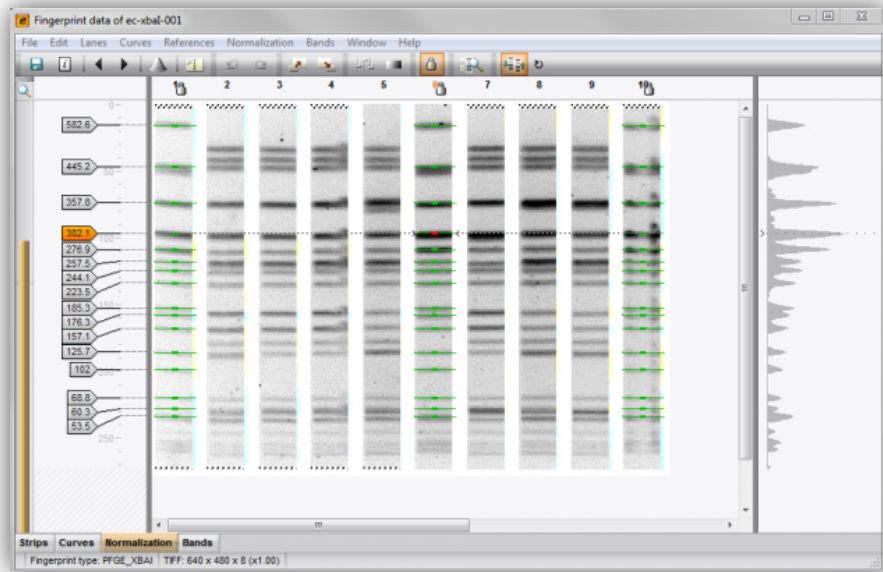


**Figura 24.** Gel de agarosa de PFGE en CHEF-DR III (Bio-Rad).



**Figura 25.** Imagen de los patrones de bandas en el gel de agarosa de PFGE.

El análisis de los patrones de bandas se realizó mediante el software Bionumerics v.7.6 (Applied Maths, Bélgica) (Figura 26). Los pasos seguidos en el procesamiento de la imagen del gel son: (1) normalización, (2) resolución, (3) sustracción de fondo, (4) suavizado y (5) búsqueda de bandas. Posteriormente, se construyó un dendrograma usando el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo de análisis de *clusters* UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*). El criterio de interpretación de bandas se basó en el establecido previamente por Tenover <sup>61</sup>, comparándose con los criterios establecidos más recientemente por Miragaia <sup>103</sup>.



**Figura 26.** Análisis de los patrones de bandas de PFGE mediante Bionumerics v.7.6 (Applied Maths).

Este análisis se aplicó en las cepas de los grupos IPA y CQ. Se excluyeron las cepas del grupo PS debido a la divergencia esperada entre ellas ya que no existía ninguna relación clínica ni epidemiológica.

## 4.11. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Para la caracterización de las cepas de *S. epidermidis*, se utilizó la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), descrita por Thomas *et al.*<sup>62</sup>. La técnica MLST se ha utilizado para estudios de genética de

poblaciones y de evolución de clones pandémicos, a diferencia de PFGE que se aplica más en estudios de brotes y epidemiología local. Se basa en la amplificación y secuenciación de 7 genes conservados (*housekeeping*): *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA* y *yqiL* (Tabla 19). Mediante la PCR y secuenciación de estos genes se obtiene un número de alelo de cada gen y el conjunto de los 7 alelos da lugar al secuenciotipo (ST), es decir, cada cepa se caracteriza por un perfil de siete números de alelos que corresponde a un ST. El análisis de secuencias se llevó a cabo mediante Bionumerics v7.6, el cual analiza automáticamente las secuencias y se conecta con la base de datos de MLST. La asignación de las secuencias tipo se realiza mediante la base de datos de MLST de *S. epidermidis* (<http://sepidermidis.mlst.net>), en función del perfil alélico de cada cepa. Si la secuencia no coincide con ningún alelo quiere decir que se trata de un nuevo alelo que no ha sido descrito anteriormente, al cual se le asigna un nuevo número de alelo a través de la base de datos de MLST.

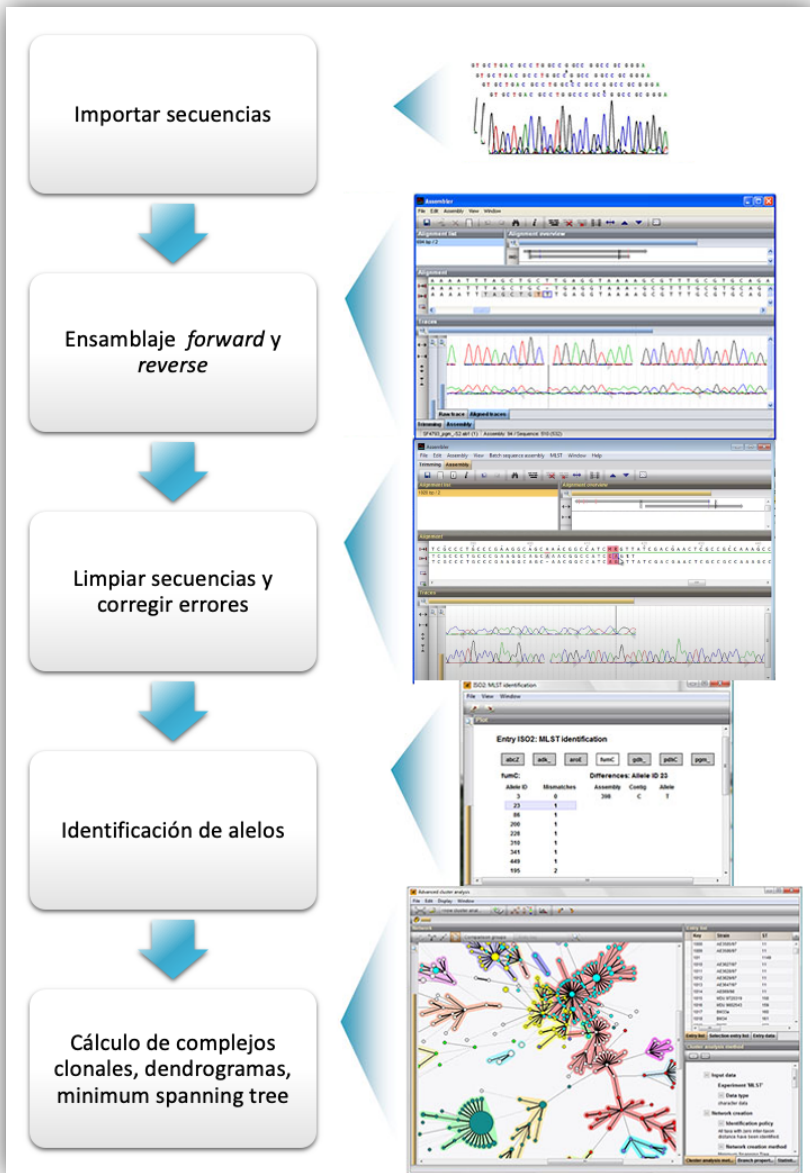


**Tabla 19.** Genes y condiciones para MLST de *S. epidermidis*.

Gen y función	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del amplificado	Condiciones de PCR
<b>Carbamato kinasa</b> <i>(arcC)</i>	F: TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG R: TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	465	95°C 3 min; 34 ciclos de 95°C 30 s, 50°C 1 min y 72°C 1 min; 72°C 10 min
<b>Shikimato deshidrogenasa</b> <i>(aroE)</i>	F: CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC R: CAACGCAAATCTGTTGGGG	420	
<b>Glutamil-tRNA Reductasa</b> ( <i>gtr</i> )	F: CAGCCAATTCTTTATGACTTTT R: GTGATTAAGGTATTGATTTGAAAT	438	
<b>Proteína de reparación DNA mismatch</b> ( <i>mutS</i> )	F: GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA R: GTAATCGTGCTAGTTATCATGTT	412	
<b>Pirimidina biosíntesis</b> ( <i>pyrR</i> )	F: GTTACTAATACTTTTGTCTGTGTT R: GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA	428	
<b>Triosafosfato Isomerasa</b> ( <i>tpiA</i> )	F: ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC R: TTAATGATGCGCCACCTACA	424	
<b>Acetil coenzima A acetiltransferasa</b> ( <i>yqiL</i> )	F: CACGCATAGTATTAGCTGAAG R: CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	416	

El procedimiento de análisis de secuencias de los genes MLST en Bionumerics v7.6 es el siguiente (Figura 27):

1. Importar secuencias de los 7 genes *housekeeping* de cada cepa.
2. Ensamblaje de las secuencias *forward* y *reverse*.
3. Las secuencias se recortan automáticamente en función del inicio y final del gen y se colocan en la dirección correcta.
4. Limpiar secuencias, reducir el ruido de fondo y corregir errores.
5. Identificación de los alelos mediante la conexión con la base de datos MLST.
6. Obtención del perfil alélico de los 7 genes.
7. Otras aplicaciones: complejos clonales, dendrogramas, *minimum spanning tree*...



**Figura 27.** Esquema del análisis de las secuencias de los genes de MLST mediante Bionumerics v7.6 (Applied Maths).

Además, los STs pueden agruparse en Complejos Clonales (CC), que son grupos de STs biológicamente significativos que se han diversificado a partir de un ancestro común. Los STs que se encuentran dentro de un mismo CC están estrechamente relacionados y sólo pueden pertenecer a un único CC. La agrupación de STs en CC se realiza mediante el software eBURST (*Based Upon Related Sequence Types*)<sup>104</sup> (<http://eburst.mlst.net>). El programa eBURST proporciona una lista de los STs asignados a cada grupo junto con sus frecuencias encontradas en el grupo. De manera que todos los STs dentro de un complejo clonal difieren en no más de un alelo entre ellos y ningún ST puede pertenecer a más de un grupo. Si difieren en dos o más alelos y no puede asignarse a ningún grupo, se define como un singleton.

Para ver la distribución de los STs y los CCs, se construye un árbol *minimum spanning tree* (MST) mediante el software Bionumerics v.7.6. Para agrupar los datos de MLST, el coeficiente de similitud utilizado es el coeficiente categórico, el cual compara los números de los alelos para comprobar si son iguales o no, y calcula la matriz de similitud y el árbol *minimum spanning tree* teniendo en cuenta las variaciones de los *locus*. El MST permite reconstruir la divergencia a corto plazo y la microevolución en las poblaciones de cepas.

## 4.12. Secuenciación del genoma completo (WGS)

La secuenciación de todo el genoma o secuenciación masiva, en inglés *whole genome sequencing* (WGS), tiene una gran utilidad en situaciones que se requiere un alto poder discriminatorio, como durante un brote hospitalario. Además, mediante WGS se pueden detectar genes de resistencia antimicrobiana y mecanismos de resistencia o genes asociados con la virulencia y la patogénesis <sup>105</sup>. En el presente estudio, se realizó WGS de las 22 cepas ST2 para estudiar la clonalidad entre ellas y, adicionalmente, detectar genes relacionados con la resistencia antimicrobiana y la formación de *biofilm*.

La plataforma de secuenciación utilizada fue Illumina Novaseq 6000 (Estados Unidos). La técnica de WGS incluye varias etapas (Figura 28) <sup>64</sup>:

1. Extracción del ADN del aislado o la muestra.
2. Cuantificación y determinación de la pureza del ADN.
3. Preparación de las librerías.
4. Secuenciación de los fragmentos de ADN.
5. Análisis bioinformático e interpretación de los datos.



**Figura 28.** Esquema de la técnica de secuenciación masiva.

#### 4.12.1. Extracción de ADN

Para obtener un ADN de gran calidad, utilizamos DNeasy® UltraClean® Microbial Kit Handbook (Qiagen, Alemania). Los microorganismos se resuspenden en una solución de perlas y son lisados por una combinación de calor, detergente y fuerzas mecánicas.

Se parte de una siembra en Agar Sangre y la inoculación en medio CT (caldo tripticasa) de una colonia aislada (ambos se incuban a 37 °C *overnight*). El procedimiento empleado es el siguiente:

### 1. Recogida de células

- Añadir 1,8 ml de cultivo a un tubo colector (*Collection Tube*) de 2 ml.
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s a temperatura ambiente y decantar sobrenadante.
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s a temperatura ambiente y decantar sobrenadante con pipeta.
- Resuspender pellet en 300 µl de la solución (*PowerBead*) y vórtex suavemente.
- Transferir a un tubo (*PowerBead Tube*).

### 2. Lisis celular

- Añadir 50 µl de *Solución SL* al *PowerBead Tube* e incubar a 70 °C durante 10 min.
- Añadir 48 µl de lisostafina e incubar a 37 °C durante 30 min.
- Añadir 20 µl de proteinasa K e incubar a 55 °C durante 10 min.
- Vórtex en el adaptador especial (*Vortex Adapter*) a la velocidad máxima durante 10 min.
- Centrifugar los tubos a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 30 s.
- Transferir el sobrenadante (300-350 µl) en un tubo colector de 2 ml.

### 3. Precipitación de proteínas

- Añadir 100 µl de *solución IRS* al sobrenadante y vórtex 5 s.
- Incubar a 4 °C durante 5 min.
- Centrifugar los tubos a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 1 min.
- Transferir sobrenadante (450 µl) a un tubo colector, evitando el pellet.

#### 4. Unión ADN

- Añadir 900 µl de *solución SB* al sobrenadante y vórtex 5 s.
- Introducir 700 µl en *MB Spin Column* y centrifugar a 10.000 x g durante 30 s a temperatura ambiente.
- Descartar el flujo, añadir el sobrenadante restante en *MB Spin Column* y centrifugar a 10.000 x g durante 30 s a temperatura ambiente.
- Descartar flujo.

#### 5. Lavados

- Añadir 300 µl de *solución CB* y centrifugar a 10.000 x g durante 30 s a temperatura ambiente.
- Descartar flujo.
- Centrifugar a 10.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente.
- Transferir *MB Spin Column* en un nuevo tubo colector de 2 ml.



## 6. Elución

- Añadir 50 µl de *solución EB* al tubo.
- Centrifugar 10.000 x g durante 30 s a temperatura ambiente.
- Descartar *MB Spin Column*.

Congelar el ADN obtenido a – 80 °C.

### 4.12.2. **Cuantificación y pureza del ADN**

Una vez extraído el ADN, se cuantifica y se evalúa la pureza mediante el fluorómetro Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer (ThermoFisher™ Scientific, Estados Unidos) y el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher™ Scientific, Estados Unidos) (Figura 29). Si el ADN obtenido se encuentra dentro de las especificaciones (Tabla 20) indicadas por la empresa Novogene (Reino Unido) (<https://en.novogene.com>), se procede al envío de las muestras de ADN.



**Figura 29.** Fluorómetro Qubit (izquierda) y espectrofotómetro Nanodrop (derecha) (ThermoFisher™ Scientific).

**Tabla 20.** Especificaciones de la calidad del ADN por Novogene (<https://en.novogene.com>).

Tipo muestra	Cantidad (Qubit)	Concentración (Qubit)	Pureza (Nanodrop)
<b>ADN genómico (plataforma Illumina)</b>	≥ 300 ng	≥ 10 ng/μl	OD <sub>260/280</sub> = 1,8-2,0

### 4.12.3. Preparación de librerías

Los pasos de preparación de librerías y secuenciación se llevaron a cabo por la empresa Novogene y la plataforma Illumina. Una vez la empresa ha recibido las muestras de ADN, se realiza un control de calidad de las muestras para saber si cumplen con las

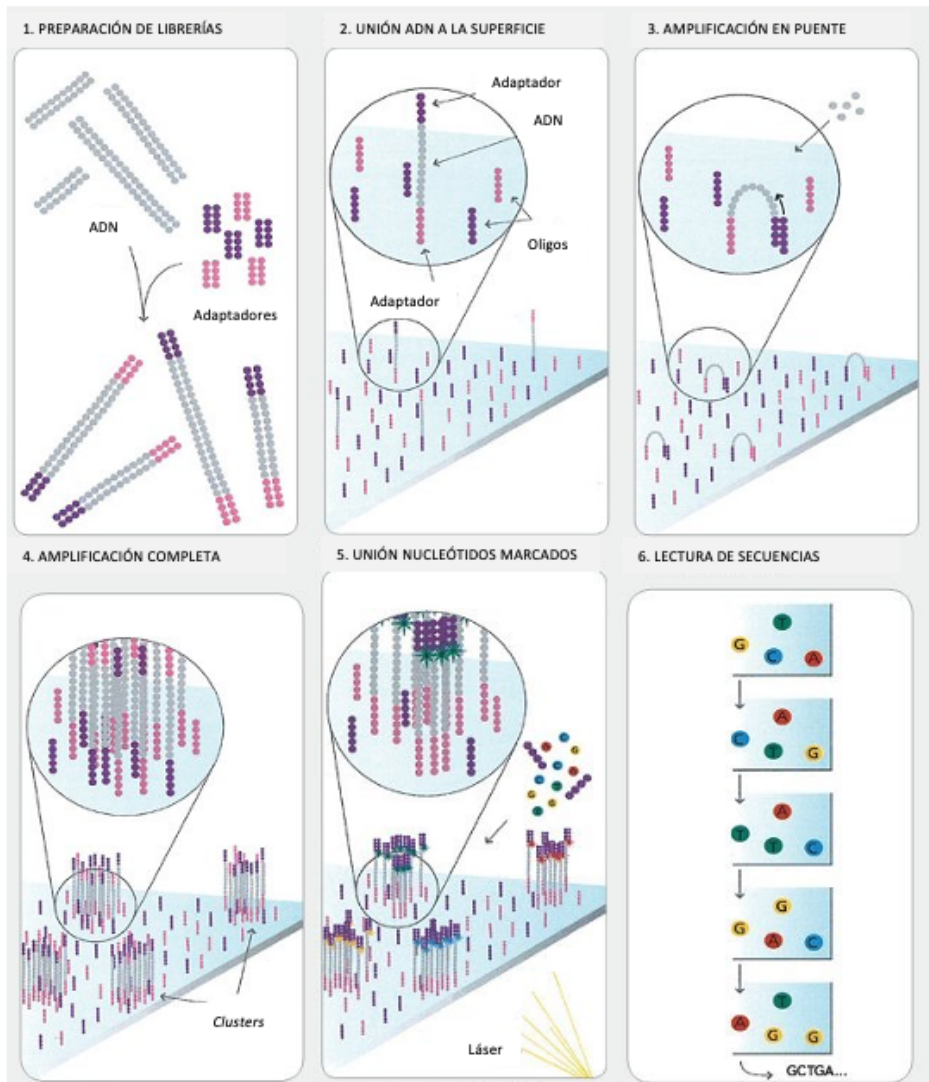
especificaciones estipuladas, si es así se continúa con el proceso, que se describe brevemente a continuación:

El primer paso es la preparación de las librerías, donde se fragmenta el ADN por tagmentación y se agregan adaptadores especializados en ambos extremos, con el fin de delimitar zonas específicas del ADN y preparar las muestras de ADN para que sean compatibles con el secuenciador. Los adaptadores también permiten fijar las moléculas de ADN a la superficie de la placa de secuenciación donde se amplificarán. Además, se añaden unas secuencias únicas (índices) que sirven como código de barras para distinguir las librerías durante el análisis de datos.

#### **4.12.4. Secuenciación**

Las librerías se cargan en el secuenciador de Illumina donde comienza el proceso que es conocido como generación de los *clusters*. Se lleva a cabo en la celda de flujo con nanopocillos con 2 oligos diferentes unidos a la superficie que se unirán a los adaptadores de los fragmentos. Los fragmentos se unen a los oligos inmovilizados en la superficie, formando un puente de amplificación y se generan *clusters* de ADN con moléculas idénticas. Es lo que se conoce como amplificación en puente, dando lugar a millones de copias de ADN monocatenario. La secuenciación propiamente dicha

empieza cuando los nucleótidos modificados químicamente se unen a la cadena de ADN plantilla. Como cada nucleótido está marcado con fluorescencia de diferente color, se emite una señal de fluorescencia al agregarse y se va realizando la lectura de las secuencias. Este paso es conocido como la secuenciación por síntesis. Después de leer la cadena de ADN directa (*forward*), el proceso se repite en la cadena inversa (*reverse*), que sería la secuenciación por pares (Figura 30) ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)). La secuenciación da como resultado millones de *reads* que representan todos los fragmentos, y se reciben en formato FASTQ.



**Figura 30.** Esquema resumido de la secuenciación por Illumina. Adaptación de [www.illumina.com](http://www.illumina.com).

#### 4.12.5. Análisis bioinformático

Después de la secuenciación del ADN, se procede al análisis bioinformático de datos mediante diferentes programas.

En nuestro estudio, el análisis bioinformático se realizó en Ubuntu 18.04:

- Primero utilizamos el programa Trim galore (Github) ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)), el cual engloba diferentes programas para eliminar los adaptadores basándose en Cutadapt <sup>106</sup>, encargado de encontrar y eliminar las secuencias de adaptadores de Illumina, cebadores y secuencias inferiores a 50 pares de bases.
- Para el análisis filogenético se utilizaron los siguientes softwares informáticos:
  - Unicycler: para realizar el ensamblaje de los *reads* basado en SPAdes <sup>107</sup>.
  - Prokka: para la anotación rápida de genomas procariotas, es decir, para la localización de genes en un genoma, su estructura y las proteínas que codifican <sup>108</sup>.
  - Roary: para estudiar la distribución del *pan genome* de un conjunto de aislamientos, identificando los genes del *core genome* y *accessory genome* <sup>109</sup>.

- Gubbins: para identificar recombinaciones utilizando un algoritmo que identifica los *loci* que contienen densidades elevadas de sustituciones de bases y a la vez, construye una filogenia basada en mutaciones fuera de estas regiones. Su aplicación se basa en disminuir los efectos confusos de la recombinación <sup>110</sup>.
- RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*): para el análisis filogenético de grandes conjuntos de datos, concretamente para generar un árbol filogenético *maximum likelihood* (ML) <sup>111</sup>.
- FigTree: es un visor gráfico de árboles filogenéticos y un editor de figuras. Muestra los archivos resumidos y anotados generados a partir de una variedad de programas (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).
- Phandango: es una aplicación web interactiva que permite la visualización rápida y la exploración interactiva de grandes conjuntos de datos genómicos <sup>112</sup>.
- Script de R: para determinar las diferencias de SNPs a partir del alineamiento del *core genome* generado por Snippy y anotar el árbol generado por RaxML, que se explicará a continuación. Se utilizaron las siguientes librerías: ggtree, ggplot2, ape, seqinr, dplyr, msa, tidyverse.

- Para realizar un ensamblaje de referencia (*map to reference*), necesitamos una secuencia conocida para poder realizar un

alineamiento de nuestros *reads* contra una secuencia de referencia y localizar diferencias o polimorfismos de nucleótido único, en inglés *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). La secuencia de referencia queda en la parte superior con todas las demás secuencias alineadas debajo de ella. Para este fin, se utiliza la herramienta Snippy (<https://omictools.com/snippy-tool>), la cual encuentra tanto sustituciones como inserciones/delecciones y SNPs, además de generar un alineamiento múltiple de todas las secuencias analizadas en formato fasta. Utilizamos el programa Gubbins para eliminar las posibles variaciones producidas debido a procesos de recombinación. Posteriormente, podemos introducir el alineamiento sin eventos de recombinación en el RAxML para crear un árbol filogenético por máxima verosimilitud, en inglés *maximum likelihood* (ML), utilizando el modelo evolutivo GTR. El árbol se crea utilizando 1.000 permutaciones para obtener los valores de *bootstrap*. En nuestro estudio, se utilizó como secuencia de referencia la cepa *S. epidermidis* BPH0662 (NZ\_LT571449.1). Se eligió esta cepa de referencia porque es ST2, al igual que nuestras cepas secuenciadas, y el genoma está estrechamente relacionado con el de nuestras cepas, lo que reduce las posibilidades de desajustes y aumenta las regiones comunes en el mapeo de las secuencias con el genoma de referencia. También se compararon nuestras cepas con las cepas de *S. epidermidis* del estudio de Méric *et al.* <sup>113</sup> (*BioProject* PRNJA433155), que incluyen cepas pertenecientes tanto al ST2 como a otros secuenciotipos.



- Para el estudio de genes de resistencia antimicrobiana y determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles, se utilizaron diferentes softwares y otras herramientas complementarias para su análisis:

- Simulador de PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es>): simulación de PCR (amplificación de secuencias de ADN específicas) en línea <sup>114,115</sup>.
- CGE (*Center for Genomic Epidemiology*) (<http://www.genomicepidemiology.org>): recoge una variedad de softwares con diferentes objetivos. En nuestro caso, para detectar los genes de resistencia a antibióticos adquiridos y las mutaciones, se utilizó ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), para determinar la presencia de genes de virulencia se empleó VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) y para la tipificación del cassette SCCmec se usó SCCmecFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>).
- CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (<https://card.mcmaster.ca/about>): para la determinación de genes de resistencia a antibióticos.
- NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>): para la determinación de genes de resistencia a antibióticos.

- Base de datos pubmlst de *S. epidermidis* (<https://pubmlst.org/sepidermidis/>): para determinar el MLST.
- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): para la identificación y alineación de secuencias genéticas.
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>): para la alineación de secuencias múltiples (tres o más secuencias).
- ExPASy (<https://www.expasy.org>): para traducir secuencias de nucleótidos (ADN/ARN) a secuencias de proteínas, y a la inversa.

- Adicionalmente, se realizó un estudio de asociación del genoma completo, en inglés *Genome-Wide Association Study* (GWAS), que tiene como objetivo determinar el efecto de la variación genética asociada a un fenotipo de interés en una población bacteriana, como la resistencia a los antibióticos o la virulencia <sup>116</sup>. En nuestro caso, se estudió como rasgo característico el secuentipo ST2 y la infectividad de 262 cepas *S. epidermidis*: 22 cepas ST2 de nuestro hospital y 240 cepas *S. epidermidis* de varios STs del estudio de Méric *et al.* <sup>113</sup>.

Para el análisis de GWAS, se utilizaron los softwares Scoary, pyseer y UniProt.

- Scoary: calcula la asociación entre la presencia y ausencia de genes del pangenoma y los fenotipos de interés (ST2 e infectividad). El resultado se muestra en una lista de los genes ordenados en función del grado de asociación con el rasgo <sup>117</sup>.
- Pyseer: utiliza modelos lineales para intentar asociar variaciones (*k*-mers) a características fenotípicas. Analiza tanto pequeñas variaciones como la presencia/ausencia de genes <sup>118</sup>. Los *k*-mers significativos (valor  $p < 2,45 \times 10^{-8}$ ) se mapearon a una secuencia de referencia de *S. epidermidis* ST2 (BPH0662) anotada para encontrar regiones del genoma asociadas al fenotipo (ST2 e infectividad), tal y como se describe en la documentación del programa (<https://pyseer.readthedocs.io/en/master/usage.html>).
- UniProt (<https://www.uniprot.org>): base de datos que recopila información funcional de proteínas, secuencia de aminoácidos, descripción de la proteína, datos taxonómicos, entre otros.

### 4.13. Detección de genes de resistencia

Se estudiaron genes de resistencia a algunos de los antibióticos evaluados en el apartado de sensibilidad antibiótica mediante la

detección por PCR. Cabe resaltar que se realizó la detección de los genes de resistencia solamente a las cepas resistentes.

Se seleccionaron los siguientes genes de resistencia en función de su prevalencia en *S. epidermidis* según la literatura (Tabla 21):

- Oxacilina: *mecA*.
- Eritromicina: *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* y *mphC*.
- Clindamicina: *InuA/A'*.
- Cotrimoxazol: *dfrS*.
- Linezolid: *cfr*, rRNA 23S, L3, L4, L22.
- Aminoglucósidos: *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* y *ant(4')-IaC*.

**Tabla 21.** Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas en el estudio de los genes de resistencia.

Antibiótico	Gen de resistencia	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado	Condiciones PCR	Referencia
Oxacilina	<i>mecA</i> (penicillin binding protein 2)	F: AAAATCGATGGTAAAGTTGGC	533	40X (94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min)	Murakami K et al. (1991)
		R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTCG			
Eritromicina	<i>ermA</i> (erythromycin resistance methylase)	F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R: CTTCGATAGTTTATAATATTAGT	645	30X (94 °C 30 s; 52 °C 30 s, 72 °C 1 min)	Gómez-Sanz et al. (2010)
	<i>ermB</i> (erythromycin resistance methylase)	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATGTTTAC	639	30X (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min)	
	<i>ermC</i> (erythromycin resistance methylase)	F: AGTACAGAGGTGAATTCG R: AATTCCTGCATGTTTTAAGG	642	30X (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min)	
	<i>msrA</i> (macrolide streptogramin resistance)	F: GGCACAATAAGAGTGTTAAAGG R: AAGTTATATCATGAATAGATTGCTCCTGT	399	35X (94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min)	Gómez-Sanz et al. (2010)
	<i>mphC</i> (macrolide phosphotransferase)	F: GAGACTACCAGACCTGACG R: CATACCCGATTCTCTGAT	530	35X (94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min)	
Clindamicina	<i>lnu(A/A')</i> (lincomycin resistance protein)	F: GGTGGCTGGGGGTAGATGTATTAACCTGG R: GCTTCTTTGAAATACATGGTATTTTCGATC	323	30X (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min)	Gómez-Sanz et al. (2010)
Cotrimoxazol	<i>dhfrS</i> (dihydrofolate reductase)	F: GTCGCTCACGATAAACAAGAGT R: TACGTCTATTTGGCAATGGCTCCC	160	35X (94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min)	McManus BA et al. (2015)
Linezolid	<i>cfr</i> (ribosomal RNA large subunit methyltransferase)	F: TGAAGTATA AAGCAGTTGGGAG R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	746	35X (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 74 °C 30 s)	Mendes RE et al. (2010)
		<i>rRNA 23S</i>	F: AACGATTTGGGCACTGTCTCAACG R: AATTTCTACGCCACGACGGATA	660	
	L3		F: GTTGACGCTTTAATGGGCTTA R: ACCCTGATTTAGTCCGCTCTA	822	
	L4	F: GGTAACACTGTAACGT R: TCGCTTACCTCCTTAATG	1200	35X (94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min)	
	L22	F: GCAGACGACAAGAAAACAAG R: CAACACGAAGTCCGATTGGA	350	35X (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min)	
	Aminoglicósidos	<i>aac(6')-Ib_aph(6)-Ia</i> (6'aminoglycoside N-acetyltransferase / 2"-aminoglycoside phosphotransferase)	F: TATACAGAGCTTGGGAAGATG R: CCTCGTAATTTCATGTTCTGGCA	352	
<i>ant(4)-IaC</i> (aminoglycoside adenyltransferase)		F: TAGCTGAATAAAGAAGGTTGCTCTC R: CACTCCACCTTCCACTCACC	312	34X (94 °C 30 s, 61 °C 1 min, 72 °C 1 min)	

#### 4.13.1. Tipificación cassette SCCmec

En las cepas MRSE (resistentes a meticilina/oxacilina), se realizó la tipificación del cassette SCCmec mediante el protocolo descrito por Kondo *et al.* <sup>78</sup>. Se basa en una PCR múltiple de los complejos *ccr* y *mec* para detectar el tipo de *ccr* (1-8) y la clase de *mec* (A-E) y obtener una combinación de ambos que correspondan a un tipo de SCCmec descrito: tipo I (1B) tipo II (2A), tipo III (3A), tipo IV (2B), tipo V (5C2), tipo VI (4B), tipo VII (5C1), tipo VIII (4A), tipo IX (1C2), tipo X (7C1) y tipo XI (8E) (Tabla 13 Introducción) ([www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)).

#### 4.14. Formación fenotípica del *biofilm*

La formación del *biofilm* se llevó a cabo mediante el protocolo de tinción con cristal violeta, realizando ajustes a una combinación de protocolos descritos <sup>119-122</sup>.

Se utilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos, la cepa de *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) como control positivo (formador de *biofilm*) y la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 como control negativo (no formador de *biofilm*). Se cuantificó la formación fenotípica de *biofilm* con la lectura de la densidad óptica (DO<sub>570nm</sub>) en el equipo Epoch (BioTeK, Estados Unidos). Este experimento se

debe repetir como mínimo tres veces y con duplicado de muestra para generar datos confiables.

Se siguieron los siguientes pasos:

#### Día 1: Preparación

- Sembrar las cepas en Agar Sangre e incubar a 37°C durante 24h.
- Preparar medio de cultivo: caldo tripticasa de soja (TSB) con 0,25% de glucosa (TSBG).

#### Día 2: Precultivos

- Preparar precultivos: 5 ml de TSB en cada tubo.
- Añadir 1-2 colonias.
- Incubar en el baño 37°C durante 24h, sin agitación.
- Añadir 396 µl de TSB en un *ependorf*.

#### Día 3: Placa

- Añadir 4 µl de cultivo bacteriano en el *ependorf* (volumen total de 400 µl).
- Añadir 200 µl del contenido del *ependorf* en cada pocillo de la placa de 96 pocillos (cada muestra por duplicado).
- Incubar a 37°C durante 24h sin agitación.

#### Día 4: Tinción y cuantificación

- Descartar el cultivo de la placa suavemente con una pipeta y eliminar el resto sobre un papel absorbente.

- Lavar 2 veces suavemente con PBS 1%.
- Incubar placa a 60°C durante 30 min para fijar el *biofilm*.
- Añadir 100 µl de cristal violeta 1% e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
- Descartar cristal violeta.
- Lavar 5 veces con PBS 1%.
- Añadir 200 µl de ácido acético 33% para resuspender el *biofilm* e incubar a temperatura ambiente durante 20 min con agitación.
- Cuantificar la formación de *biofilm* mediante la medición de la densidad óptica  $DO_{570nm}$ , en el equipo Epoch (Figura 31).



**Figura 31.** Cuantificación de la formación fenotípica del *biofilm*.



### Interpretación de los resultados:

Dentro de cada experimento, se calcula el promedio de la absorbancia y la desviación estándar de cada cepa, teniendo en cuenta que se hace por duplicado de muestra y triplicado de experimento. Además, como se incluyen blancos (sin microorganismo, solo medio de cultivo), se calcula el promedio de los blancos para hacer el ajuste con las muestras, es decir, se resta el resultado del blanco a las muestras. La formación de *biofilm* se clasificó en cuatro categorías según los resultados obtenidos de las densidades ópticas, aplicando los cálculos que se han explicado anteriormente (Tabla 22).

**Tabla 22.** Categorías de formación de biofilm.

<b>DO<sub>570nm</sub></b>	<b>Grado de formación de biofilm</b>
<b>&lt; 0.4</b>	no formador
<b>0.4 – 1</b>	débil
<b>1 – 2</b>	moderado
<b>&gt; 2</b>	fuerte

DO: densidad óptica.

#### 4.15. Detección de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y otros elementos

Se estudió la presencia o ausencia de varios genes asociados a la formación de *biofilm* y elementos móviles en *S. epidermidis*, mediante PCR. Las condiciones de PCR se incluyen en la Tabla 23.

Los genes analizados se dividieron en función de la fase de la formación de *biofilm* que están implicados (Tabla 23):

- Fase de adhesión: *embp*, *sesI*, *atIE*, *sdrG* y *sdrF*.
- Fase de acumulación: operón *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* y *icaR*), *bhp* y *aap*.
- Fase de maduración y dispersión: *hld*.
- *Quorum sensing*: *agr* y *luxS*.
- Elementos móviles: secuencia de inserción *IS256*, *arginine catabolic mobile element* (ACME) y el cassette cromosómico *SCCmec*.

**Tabla 23.** Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas en el estudio de los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles.

Función	Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado	Condiciones PCR	Referencia		
Adhesión	<i>atlE</i> (bifunctional autolysin)	F: GTCAACACTTTACACAGTTCCT R: TACTTGTTTAGGTGCTGGTG	721	25X (94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min)	Este estudio		
	<i>sdrG</i> (serine-aspartate repeat-containing protein G)	F: CTCAGAAGGCAATTCTGTATGG R: AACGCTCTAAACCTGCAAA	Variable	35X (95 °C 30 s, 55 °C 3 min, 72 °C 2 min)	Monk AB <i>et al.</i> (2007)		
	<i>sdrF</i> (serine-aspartate repeat-containing protein F)	F: GTACGAAAACACAGTCAAGT R: ATCTGCGTCTGAGTCACTGTC	758	25X (94 °C 30 s, 52 °C 30s, 72 °C 1 min)	Este estudio		
	<i>sesI</i> ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> surface protein I)	F: GCTGATTATGTAATGACTCAAAT R: AGCTTTGTGTTTGAGCTTC	408	30X (94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min)	B Söderquist <i>et al.</i> (2009)		
	<i>embp</i> (extracellular matrix binding protein)	F: AGCGGTACAAATGTGAATATC R: AGAAGTGCTCTAGCATCATCC	455	30X (94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min)	Salgueiro <i>et al.</i> (2017)		
Biofilm	<i>icaA</i> (poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine synthase)	F: ACAGTCTGCTACGAAAAGAAA R: GGAAATGCCATAATGACAAC	103	30x (94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min)	Solati SM <i>et al.</i> (2015)		
	<i>icaB</i> (poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine N-deacetylase)	F: CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA R: AAAGTCCCATAAGCCTGTTT	302	30x (94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min)			
	<i>icaC</i> (poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine export protein)	F: TAACCTTAGGCGCATATGTTTT R: TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	400	30x (94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min)			
	<i>icaD</i> (poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine synthesis protein IcaD)	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R: CGTGTTTTCAACATTAATGCAA	198	30x (94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min)			
	<i>icaR</i> (biofilm operon <i>icaADBC</i> HTH-type negative transcriptional regulator IcaR)	F: TAATCCCGAATTTTTGTGAA R: AACGCAATAACCTTATTTCC	469	30x (94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min)			
	<i>bhp</i> (cell wall associated biofilm protein)	F: TGGTATTAGGAAGCTCTCAG R: ATACCAGCGTGACGCAAAATC	832	25X (94 °C 30 s, 52 °C 45s, 72 °C 1 min)		Chessa D <i>et al.</i> (2016)	
	<i>aap</i> (accumulation associated protein)	F: TCACTAAACAACCTGTTGACGAA R: AATTGATTTTTATTATCTGTTGAATGC	Variable	35X (95 °C 30 s, 52 °C 30s 72 °C 1 min)		Monk AB <i>et al.</i> (2007)	
	Maduración/ Desprendimiento	<i>hld</i> (delta hemolysin)	F: ACACTGAGTCCAAGGAAA R: CATAATCATGTCCGAACTT	Variable		35X (95 °C 45 s, 52 °C 45s, 72 °C 1 min)	B Hellmark <i>et al.</i> (2013)
		<i>agr</i> (accessory gene regulator protein)	F: GCAGCAACTAAGAAAACACC R: CGTGATTATAATATGCTTCGATT	1021		35X (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72°C 1 min)	Li M <i>et al.</i> (2004)
	Quorum sensing	<i>luxS</i> (S-ribosylhomocysteine lyase)	F: TCGTCTAGCCGGACTATGG R: CAGCCCAACCATTGAACC	315		30X (95 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min)	Li M <i>et al.</i> (2008)
Elementos móviles	Secuencia de inserción	<i>IS256</i>	F: AGTCCTTTACGGTACAATG R: TGTGCGCATCAGAAAATAACG	762	25X (94 °C 30 s, 52 °C 30s, 72 °C 1 min)	Chessa D <i>et al.</i> (2016)	
		<i>arc</i> (arginine deiminase)	F: GAGCCAGAAGTACGCGAG R: CACGTAACCTGCTAGAACGAG	671	30X (95 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min)	Miragaia M <i>et al.</i> (2009)	
	ACME (arginine catabolic mobile element)	<i>opp3</i> (oligopeptide permease ABC transporte)	F: GCAAATCTGTAATGGTCTGTTC R: GAAGATTGGCAGCACAAAGTG	1183	30X (95 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min)		
		<i>kdp</i> (potassium-transporting ATPase ATP-binding subunit)	F: CGGTTTAACTGGTGGCGTT R: GCAATACATACAGCGTAGCC	241	35X (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s)	O'Connor AM <i>et al.</i> (2018)	
	SCCmec	<i>mA1</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286	30X (94 °C 2 min, 57°C 1 min, 72 °C 2 min)	Kondo Y <i>et al.</i> (2007)	
		<i>mA2</i>	AACGTTGTAACCCCAAGA				
		$\alpha 1$	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695			
		$\alpha 2$	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937			
		$\alpha 3$	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	1791			
		$\beta c$	ATTGCTTGATAATAGCCTTCT				
$\alpha 4.2$		GTATCAATGCACCAGAACTT					
$\beta 4.2$		TTGCGACTCTCTGGCGTGT	1287				
<i>yR</i>	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	518					
<i>yF</i>	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT						
<i>mI6</i>	CATAACTCCCATTCTGCAGATG	1963					

<i>IS7</i>	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2827
<i>IS2 (IS-2)</i>	TGAGGTATTGAGATATTCGATGT	804
<i>mA7</i>	ATATACCAAACCCGACAACTACA	

#### 4.15.1. Tipificación *agr* y ACME

Los productos de PCR del gen *agr*, se purificaron y secuenciaron con el fin de realizar la tipificación del gen, la cual se basa en la identificación de una secuencia de aminoácidos específica de cada tipo: tipo I (DSVCASYF), tipo II (YNPCSNYL), tipo III (YNPCASYL) y tipo IV (YNPCVMYL) <sup>50</sup>. El análisis de las secuencias se realizó mediante Bionumerics v7.6, y Clustal Omega para realizar los alineamientos de las secuencias de aminoácidos descritas con las secuencias de nuestras cepas.

El tipo de ACME se clasificó de acuerdo con la presencia de los genes *arc*, *opp3* y *kdp* por PCR, según la bibliografía descrita (Tabla 24): ACME-I (*arc* y *opp3*), ACME-II (*arc*), ACME-III (*opp3*), ACME-IV (*arc* y *kdp*), ACME-V (*arc*, *opp3* y *kdp*) and ACME-VI (*kdp*) <sup>53,55,56</sup>.

**Tabla 24.** Tipificación del elemento móvil ACME en *S. epidermidis*.

	ACME-I	ACME-II	ACME-III	ACME-IV	ACME-V	ACME-VI
<i>arc</i>	■	■	□	■	■	□
<i>opp3</i>	■	□	■	□	■	□
<i>kdp</i>	□	□	□	■	■	■

En gris: presencia, en blanco: ausencia, ACME: *arginine catabolic mobile element*.

## 4.16. Análisis de datos

Las variables categóricas fueron comparadas mediante la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. Las variables continuas se compararon usando Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Todas las comparaciones se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics v25. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Se contó con el soporte del Departamento de Estadística del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau para el análisis de datos.

## **4.17. Aspectos éticos**

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IIBSP-STA-2016-81) (Ver Anexo I). Todos los participantes del estudio firmaron un consentimiento informado (Ver Anexo II).



# 5. Resultados







## 5.1. Cepas del estudio

Se estudiaron un total de 117 cepas de *S. epidermidis* (Tabla 25): 50 cepas de pacientes con infección de prótesis articular de rodilla y cadera (IPA), 50 cepas comensales de la piel y fosas nasales de personas sanas (PS) y 17 cepas del campo quirúrgico de pacientes que se sometieron a una artroplastia primaria (CQ).

**Tabla 25.** Origen de las cepas de *S. epidermidis* incluidas en el estudio.

Origen	Cepas (n)	Pacientes/ Participantes (n)	Origen cepa n (%)				Edad	Género n (%)	
			Cadera	Rodilla	Nariz	Piel	Rango (media)	Hombres	Mujeres
IPA	50	39	31 (62)	19 (38)	-	-	46-93 (72,5)	18 (46,2)	21 (53,8)
PS	50	38	-	-	37 (74)	13 (26)	18-96 (52,5)	21 (55,3)	17 (44,7)
CQ	17	15	5 (29,4)	12 (70,6)	-	-	67-85 (75,4)	6 (40)	9 (60)

IPA: infección de prótesis articular, PS: personas sanas, CQ: campo quirúrgico.

Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la selección de los aislados fueron los siguientes:

- En el caso de las cepas **IPA** y **CQ**, se incluyó una cepa por paciente, excepto en los casos en que el antibiograma era diferente entre cepas del mismo paciente o cuando las fechas de obtención de las cepas eran diferentes. Aplicando estos criterios, las cepas de *S.*

*epidermidis* se aislaron de 39 pacientes con IPA, a partir de rodilla (n=19, 38%) y cadera (n=31, 62%) (Tabla 25). En 30 casos, se obtuvo una cepa por paciente, en 7 casos, dos cepas por pacientes, y en dos casos, tres cepas por paciente. Es decir, en los casos de dos y tres cepas por paciente, las cepas se diferenciaron en su antibiograma o en la fecha de recogida.

En el caso de las cepas provenientes del campo quirúrgico de pacientes a los que se les ha implantado una prótesis (CQ), se incluyó una cepa por paciente (de 13 pacientes) y dos cepas de dos pacientes.

- En la población de cepas **PS**, se recogían cepas de origen nasal y de la piel en cada participante. Se incluyó una cepa por participante si el antibiograma era igual y las cepas se consideraban equivalentes, y se incluían las dos cepas si el antibiograma era diferente y las cepas se consideraban diferentes. También podía darse el caso de no encontrarse simultáneamente cepas de *S. epidermidis* en estos dos puntos de muestreo (fosas nasales y piel), entonces se incluía la cepa *S. epidermidis* que se encontraba en uno de los territorios.

Con estos criterios, ocho participantes tuvieron los dos aislados, tanto de la piel como de las fosas nasales con el mismo antibiograma. En 13 casos, se recuperaron dos aislados, los cuales tuvieron diferente antibiograma. En el resto de participantes (n=16), solo se pudieron obtener colonias de *S. epidermidis* en uno de los dos orígenes. Cabe destacar que solo en un participante no se

encontró *S. epidermidis* en la muestra nasal, el resto de casos fueron de muestra de piel (n=13). En resumen, se seleccionó una cepa en 24 participantes y dos cepas en 13 participantes.

En general, la proporción de hombres y mujeres en los tres grupos fue bastante equivalente (Tabla 25). La media de la edad fue similar en los grupos de IPA (72,5) y CQ (75,4) (Tabla 25), aunque el rango de edad fuese más amplio en IPA (IPA: 46-93, versus CQ: 67-85). La mayoría de casos correspondieron a personas con una edad superior a 60 años (84%), considerada la población con más frecuencia de artroplastias.

Los participantes sanos del grupo PS fueron elegidos con un rango más amplio de edad, teniendo en cuenta que su inclusión principal era que se tratase de personas sanas sin contacto previo con el ambiente hospitalario, ni tratamientos antimicrobianos; lo que suele ser menos común en personas de mayor edad. La mitad de participantes sanos fueron mayores de 50 años y la otra mitad con un rango de edad de 18-50 años.

Como podemos observar en la Tabla 25, se estudiaron más casos de IPA de cadera que de rodilla y, en cambio, en el contexto de búsqueda de cepas en CQ, se estudiaron más prótesis de rodilla que de cadera.

Ninguno de los pacientes a los que se les realizó una artroplastia (CQ) ha tenido infección (IPA), hasta el momento. El tiempo de

seguimiento de los casos es más de un año en todos los pacientes: 1 año (n=6), 2 años (n=7), 3 años (n=4).

## 5.2. Estudio de la sensibilidad antibiótica

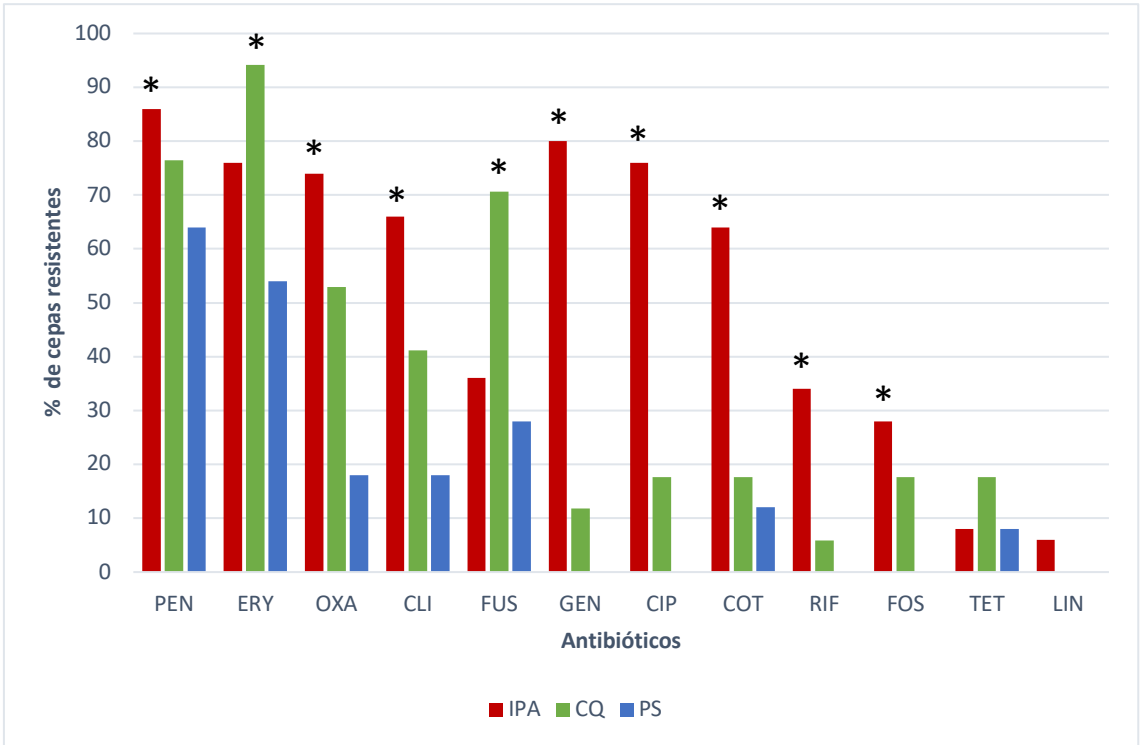
Las tasas de resistencia a los antibióticos evaluados mediante el sistema Sensititre se indican en la Tabla 26. En general, se observaron porcentajes elevados de resistencia a la mayoría de los antibióticos en las cepas de *S. epidermidis*: 75,2% a penicilina (PEN), 69,2% a eritromicina (ERY), 47% a oxacilina (OXA), 41,9% a clindamicina (CLI), 37,6% a ácido fusídico (FUS), 35,9% a gentamicina (GEN), 35% a ciprofloxacino (CIP) y 35% a cotrimoxazol (COT). Todas las cepas permanecieron sensibles a teicoplanina, vancomicina, daptomicina y tigeciclina.

Los porcentajes de resistencia más elevados se observaron en las cepas IPA en comparación con las cepas PS y CQ (Tabla 26 y Figura 32). Para los antibióticos penicilina (86%), oxacilina (74%), clindamicina (66%), gentamicina (80%), ciprofloxacina (76%), cotrimoxazol (64%), rifampicina (34%) y fosfomicina (28%), las tasas de resistencia fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) más altas en las cepas IPA, que en las cepas PS y CQ.

**Tabla 26.** Tasas de resistencia a antibióticos en cepas de *S. epidermidis*.

Antibiótico n (%)	TOTAL (n=117)	IPA (n=50)	CQ (n=17)	PS (n=50)	valor <i>p</i>
<b>Penicilina</b>	88 (75,2)	43 (86)	13 (76,5)	32 (64)	0,025
<b>Eritromicina</b>	81 (69,2)	38 (76)	16 (94,1)	27 (54)	0,002
<b>Oxacilina</b>	55 (47)	37 (74)	9 (52,9)	9 (18)	<0,001
<b>Clindamicina</b>	49 (41,9)	33 (66)	7 (41,2)	9 (18)	<0,001
<b>Ácido fusídico</b>	44 (37,6)	18 (36)	12 (70,6)	14 (28)	0,008
<b>Gentamicina</b>	42 (35,9)	40 (80)	2 (11,8)	0 (0)	<0,001
<b>Ciprofloxacino</b>	41 (35)	38 (76)	3 (17,6)	0 (0)	<0,001
<b>Cotrimoxazol</b>	41 (35)	32 (64)	3 (17,6)	6 (12)	<0,001
<b>Rifampicina</b>	18 (15,4)	17 (34)	1 (5,9)	0 (0)	<0,001
<b>Fosfomicina</b>	17 (14,5)	14 (28)	3 (17,6)	0 (0)	<0,001
<b>Tetraciclina</b>	11 (9,4)	4 (8)	3 (17,6)	4 (8)	NS
<b>Linezolid</b>	2 (1,7)	2 (4)	0 (0)	0 (0)	NS

NS: diferencia no significativa estadísticamente, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas. Todas las cepas permanecieron sensibles a teicoplanina, vancomicina, daptomicina y tigeciclina. Valor *p* significativo <0,05.



**Figura 32.** Comparación de las tasas de resistencia a antibióticos en las 3 poblaciones de cepas de *S. epidermidis*. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas, PEN: penicilina, ERY: eritromicina, OXA: oxacilina, CLI: clindamicina, FUS: ácido fusídico, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacino, COT: cotrimoxazol, RIF: rifampicina, FOS: fosfomicina, TET: tetraciclina, LIN: linezolid. \* $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas comparando las 3 poblaciones de cepas.

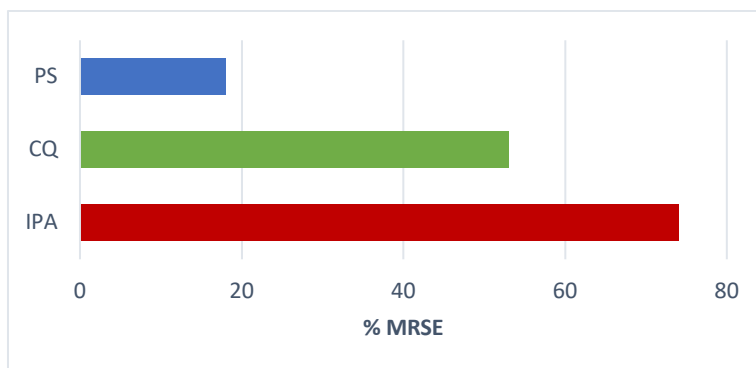
Entre las cepas PS y CQ, las cepas CQ mostraron tasas más altas de resistencia antimicrobiana que las cepas PS. Se destaca el elevado porcentaje de resistencia a la eritromicina (94,1%) y al ácido fusídico (70,6%) en las cepas CQ, porcentajes que superan tanto a las cepas

IPA como las PS. Aunque, a pesar de ser valores altos, no resultan significativos por el bajo número de cepas CQ incluidas.

El fenotipo de multirresistencia (MDR), es decir, resistencia a tres o más familias de antibióticos, se observó en 68,4% del total de cepas (80/117): la mayoría de las cepas IPA (45/50; 90%), seguido de las cepas CQ (14/17; 82,4%), y en menor medida en las cepas PS (21/50; 42%). Los patrones de multirresistencia más frecuentes en todas las cepas fueron: PEN-ERY-OXA (42/117; 35,9%), PEN-ERY-CLI (36/117; 30,8%), PEN-ERY-FUS (33/117; 28,2%), PEN-ERY-GEN (31/117; 26,5%), PEN-ERY-CIP (30/117; 25,6%) y PEN-ERY-CLI-OXA (24/117; 20,5%).

Cerca de la mitad de las cepas de *S. epidermidis* fueron resistentes a la meticilina/oxacilina, en inglés *Methicillin Resistant Staphylococcus epidermidis* (MRSE) (55/117; 47%), predominando este fenotipo en las cepas IPA (37/50; 74%) en comparación con las cepas CQ (9/17; 52,9%) y cepas PS (9/50; 18%) (Tabla 26 y Figura 33).





**Figura 33.** Presencia del fenotipo MRSE en las tres poblaciones de cepas de *S. epidermidis*. MRSE: *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas,

## 5.3. Detección de genes de resistencia antimicrobiana

### 5.3.1. Por PCR

Se realizó la detección de genes de resistencia antimicrobiana mediante PCR. En la Tabla 27 se muestran los genes de resistencia estudiados para cada familia de antibióticos y los porcentajes (presencia) en cada población de estudio.

- **Resistencia a meticilina:** en las cepas MRSE, se realizó la detección del gen de resistencia *mecA*, el cual fue detectado en el 96,4% de las cepas resistentes a oxacilina (53/55) (Tabla 27). Los dos casos en los

que no se detectó el gen *mecA*, fueron cepas PS. De igual manera que la resistencia a oxacilina, el gen *mecA* estuvo significativamente ( $p < 0,05$ ) más presente en las cepas IPA (74%), que en las cepas CQ (52,9%) y PS (14%).

- **Resistencia a macrólidos:** en el presente trabajo se evaluó la eritromicina, cuya resistencia se asoció con la presencia de los genes *mphC* (73/81; 90,1%), *msrA* (72/81; 88,9%) y *ermC* (55/81; 67,9%). La combinación de *mphC+msrA* fue muy común (67/81; 82,7%). Los genes de resistencia *mphC*, *msrA* y *ermC* fueron más prevalentes en las cepas IPA (66% los tres) y las cepas CQ (82,4%, 70,6% y 64,7%, respectivamente) en comparación con las cepas PS (52%, 54% y 22%, respectivamente).

- **Resistencia a clindamicina:** el gen de resistencia *lnu(A/A')* no estuvo presente en ninguna de las 49 cepas resistentes a clindamicina.

- **Resistencia a cotrimoxazol:** el gen *dfrS* fue detectado en las 41 cepas resistentes a cotrimoxazol, y al igual que su resistencia, fue más frecuente en las cepas IPA (64%), seguido de las cepas CQ (17,6%) y las cepas PS (12%).

- **Resistencia a aminoglucósidos:** Todas las cepas resistentes a gentamicina tuvieron presente alguno de estos dos genes *aac(6')*-

*lb\_aph(6)-la/ant(4')-laC* o ambos. En 40 cepas IPA y dos cepas CQ resistentes a gentamicina estuvieron presentes los genes *ant(4')-laC* (40/42; 95,2%), *aac(6')-lb\_aph(6)-la* (35/42; 83,3%) y la combinación de ambos genes en 34/42 (81%). No se encontró resistencia a aminoglucósidos en las cepas PS.

- **Resistencia a linezolid:** las dos cepas resistentes a linezolid fueron de la misma persona, perteneciente al grupo de IPA. Se detectó el gen *cfr* y se secuenciaron el 23S rRNA y las proteínas L3, L4 y L22. El gen *cfr* no fue encontrado en ninguna de las dos cepas resistentes a linezolid, pero se observaron las mismas mutaciones en ambas cepas: la mutación G2603T en el 23S rRNA y la mutación Val154Leu en la proteína L3.

**Tabla 27.** Genes de resistencia en cepas de *S. epidermidis*.

Antibiótico	Gen de resistencia	TOTAL n <sup>a</sup> /n <sup>b</sup> (%)	IPA n <sup>a</sup> /n <sup>b</sup> (%)	CQ n <sup>a</sup> /n <sup>b</sup> (%)	PS n <sup>a</sup> /n <sup>b</sup> (%)
<b>Eritromicina</b>	<i>ermA</i>	9/81 (11,1)	5/38 (13,2)	0/16	4/27 (14,8)
	<i>ermB</i>	2/81 (2,5)	0/38	2/16 (12,5)	0/27
	<i>ermC</i>	55/81 (67,9)	33/38 (86,8)	11/16 (68,8)	11/27 (40,7)
	<i>mphC</i>	73/81 (90,1)	33/38 (86,8)	14/16 (87,5)	26/27 (96,3)
	<i>msrA</i>	72/81 (88,9)	33/38 (86,8)	12/16 (75)	27/27 (100)
	<i>ermC+mphC+msrA</i>	47/81 (58)	27/38 (71,1)	9/16 (56,3)	11/27 (40,7)
	<i>mphC+msrA</i>	67/81 (82,7)	29/38 (76,3)	12/16 (75)	26/29 (89,7)
<b>Oxacilina</b>	<i>mecA</i>	53/55 (96,4)	37/37 (100)	9/9 (100)	7/9 (77,8)
<b>Clindamicina</b>	<i>lnu(A/A')</i>	0/49	0/33	0/7	0/9
<b>Cotrimoxazol</b>	<i>dfrS</i>	41/41 (100)	32/32 (100)	3/3 (100)	6/6 (100)
<b>Aminoglucósidos</b>	<i>aac(6')-Ib_aph(6)-Ia</i>	35/42 (83,3)	35/40 (87,5)	0/2	ND
	<i>ant(4')-IaC</i>	40/42 (95,2)	39/40 (97,5)	½ (50)	ND
	<i>aac(6')-Ib_aph(6)-Ia+ant(4')-IaC</i>	34/42 (81)	34/40 (85)	0/2	ND
<b>Linezolid</b>	<i>cfr</i>	0/2	0/2	ND	ND

n<sup>a</sup>: número de cepas positivas para el gen que confiere resistencia antimicrobiana,  
n<sup>b</sup>: número de cepas resistentes, ND: no se detectó resistencia, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas.

### 5.3.2. Por WGS

Como se explicó previamente, el análisis por WGS de este estudio se realizó solo para las 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 y no de todas las cepas de *S. epidermidis*. Por lo tanto, con los resultados generados, se realizaron comparaciones entre las técnicas de WGS y PCR de estas 22 cepas.

Mediante las bases de datos disponibles como ResFinder, CARD y NCBI, y la PCR *in silico*, se detectaron los genes de resistencia por WGS. La comparación con los resultados de PCR mostró las siguientes discordancias (Tabla 28):

- Los genes *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia*, *ermC* y *mecA* se detectaron por PCR y no por WGS en una cepa diferente por cada gen.
- El gen *ant(4')-IaC* se detectó en ocho cepas por PCR y no por WGS.
- El gen *Inu(A/A')* fue detectado por WGS y no por PCR en cuatro cepas diferentes.
- Los genes *ermA*, *ermB*, *msrA* y *mphC*, no se detectaron por WGS en ninguna de las cepas secuenciadas.
- En las dos cepas resistentes a linezolid, únicamente se detectó la mutación Val154Leu en la proteína L3, a diferencia de la PCR que detectó una mutación adicional en el ARNr 23S.

**Tabla 28.** Detección de genes de resistencia por PCR y WGS.

Cepas	<i>aac(6')-lb_aph(6)-la</i> WGS	<i>aac(6')-lb_aph(6)-la</i> PCR	<i>dfzS</i> WGS	<i>dfzS</i> PCR	<i>ermC</i> WGS	<i>ermC</i> PCR	<i>lnuA</i> (A/A') WGS	<i>lnuA</i> (A/A') PCR	<i>mecA</i> WGS	<i>mecA</i> PCR	<i>ant(4')-laC</i> WGS	<i>ant(4')-laC</i> PCR
HS04												
HS07									*	*		
HS09							*	*			*	*
HS15												
HS16												
HS18												
HS27												
HS28											*	*
HS31											*	*
HS32											*	*
HS36							*	*			*	*
HS37							*	*			*	*
HS38							*	*			*	*
HS40												
HS41												
HS42												
HS47												
HS49	*	*			*	*					*	*
HS51												
HS54												
HS56												
HS57												

En color: presencia, en blanco: ausencia, en amarillo: PCR, en verde: WGS. \*: discordancia entre PCR y WGS.

## 5.4. Tipificación del cassette *SCCmec*

### 5.4.1. Por PCR

La tipificación del cassette *SCCmec* en las cepas MRSE, se realizó mediante la detección de los complejos *ccr* y *mec*, por PCR según el esquema de Kondo *et al.* <sup>78</sup>. En las cepas de este estudio, no fue posible asignar un tipo *SCCmec* a ninguna de las cepas debido a la gran variabilidad de diferentes combinaciones entre los complejos *ccr* y *mec*. En la Tabla 29, se pueden observar las combinaciones que nos encontramos en la tipificación del *SCCmec*.

**Tabla 29.** Tipificación del cassette SCCmec en este estudio.

Combinación	Complejo <i>ccr</i>				Complejo <i>mec</i>			
	<i>ccrA1B1</i>	<i>ccrA2B2</i>	<i>ccrA3B3</i>	<i>ccrA4B4</i>	<i>ccr5/ccrC</i>	<i>mecA</i>	<i>mecB</i>	<i>mecC</i>
1			■	■	■	■	■	
2	■	■					■	
3				■		■	■	
4					■			
5								
6	■	■			■		■	
7							■	
8					■	■	■	
9	■							
10			■		■	■	■	
11			■	■			■	
12	■	■						
13	■	■			■		■	
14	■	■	■				■	
15			■	■	■	■		
16		■			■		■	
17	■		■		■		■	■
18					■		■	■
19		■						■
20		■			■	■	■	
21	■	■				■	■	■

En gris: presencia, en blanco: ausencia.

En resumen, se encontraron varios tipos de *ccr* y/o *mec* en una misma cepa o incluso ninguno de ellos. Aún y así, se encontraron algunas combinaciones comunes en diferentes cepas. Las



combinaciones más frecuentes fueron: *ccr1-ccr2-mecB* (19/55; 34,5%), *ccr1-ccr2-ccr5-mecB* y *ccr3-ccr4-ccr5-mecA-mecB* (ambas 2/55; 3,6%). Estas combinaciones solo estuvieron presentes en cepas IPA.

#### 5.4.2. Por WGS

Otra de las aplicaciones de la técnica de secuenciación del genoma completo (WGS) fue tipificar el cassette *SCCmec*, pero solamente de las cepas ST2 secuenciadas. De estas 22 cepas ST2, 13 fueron positivas para el gen *mecA* y fueron las estudiadas en este apartado mediante el software *SCCmecFinder* y la PCR *in silico*. En la Tabla 30, podemos observar los resultados de WGS comparados con los de PCR, los cuales diferían entre sí, aunque coincidiesen también en algunos casos. Mediante WGS, no hubo ninguna cepa que contuviese más de un tipo de *ccr* y/o de *mec*, a diferencia de la técnica de PCR, donde fue muy común la presencia de varios tipos de *ccr* y/o *mec*. Se pudo tipificar el *SCCmec* de 10/13 cepas (77%) por WGS, de las cuales 5 cepas pertenecieron al tipo III (*ccr3-mecA*) y 5 cepas al tipo IV (*ccr2-mecB*) (50% ambos). Las 3 cepas restantes no fueron tipables ya que se detectó el tipo *mec* pero no se encontró ningún tipo de *ccr*.

**Tabla 30.** Comparación de las técnicas PCR y WGS en la tipificación del cassette *SCCmec* en las cepas ST2.

Cepa	Complejo <i>ccr</i>										Complejo <i>mec</i>				Tipo <i>SCCmec</i>			
	<i>ccr1</i> PCR	<i>ccr1</i> WGS	<i>ccr2</i> PCR	<i>ccr2</i> WGS	<i>ccr3</i> PCR	<i>ccr3</i> WGS	<i>ccr4</i> PCR	<i>ccr4</i> WGS	<i>ccr5</i> PCR	<i>ccr5</i> WGS	<i>mecA</i> PCR	<i>mecA</i> WGS	<i>mecB</i> PCR	<i>mecB</i> WGS	<i>mecC</i> PCR	<i>mecC</i> WGS	PCR	WGS
HS15							*	*	*	*			*	*			NT	III
HS16							*	*	*	*			*	*			NT	III
HS18	*	*															NT	IV
HS27			*	*													NT	IV
HS28							*	*					*	*			NT	NT
HS31								*	*				*	*			NT	III
HS40	*	*	*	*													NT	NT
HS41	*	*															NT	IV
HS42	*	*	*	*													NT	NT
HS51	*	*			*	*			*	*							NT	IV
HS54			*	*				*	*	*	*	*	*	*	*		NT	III
HS56	*	*															NT	IV
HS57							*	*	*	*							NT	III

NT: No tipable, PCR: Reacción en cadena de polimerasa, WGS: secuenciación del genoma completo, *SCCmec*: cassette cromosómico *mec*. En color: presencia, en blanco: ausencia, en amarillo: PCR, en verde: WGS. \*: discordancia entre PCR y WGS.

## 5.5. Estudios de Epidemiología Molecular Por Macrorestricción Genómica y Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Se analizaron 67 cepas digeridas con la enzima *SmaI*, de las cuales 50 correspondían a infección de prótesis (IPA) y 17 a campo quirúrgico (CQ). Como se ha mencionado anteriormente, las cepas comensales (PS) no se incluyeron ya que eran participantes sin relación epidemiológica y residían en sitios distantes geográficamente.

Los resultados obtenidos mediante PFGE se analizaron mediante el software Bionumerics v7.6. teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Tolerancia del 1,3% y optimización del 0,8%.
- Criterios de Tenover <sup>61</sup>: se consideraron cepas estrechamente relacionadas cuando los patrones de bandas diferían en menos de 2-3 bandas. De esta manera, las cepas con más de un 85%, aproximadamente, de homología se consideraron clonales.
- Se generó un dendrograma con el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

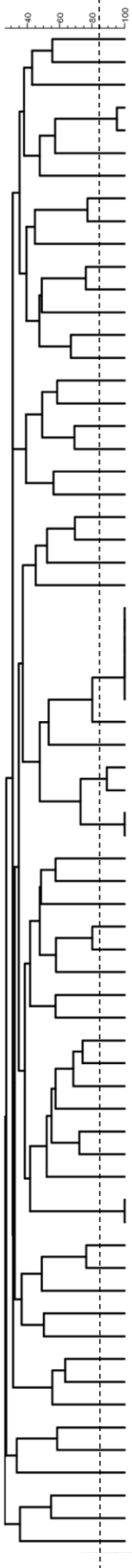
En el dendrograma obtenido (Figura 34), se observó una gran diversidad en los patrones de bandas. Las 67 cepas se distribuyeron en 58 patrones de PFGE: 6 patrones de PFGE que incluyeron diversas cepas (entre 2-5) de mismos o diferentes pacientes, y 52 patrones únicos de PFGE (35 de IPA y 17 de CQ).

Cabe destacar que los patrones de PFGE con varias cepas incluyeron dos cepas como máximo excepto el patrón de PFGE 24, el cual incluyó cinco cepas. De esas cinco cepas, tres (HS09, HS36 y HS37) pertenecieron a un mismo paciente (con una diferencia de 2 a 8 meses entre las fechas de aislamiento), la cepa HS38 a un segundo paciente y la cepa HS32 a un tercer paciente. Los patrones PFGE 28 y PFGE 44 incluyeron cepas del mismo paciente. En el patrón de PFGE 28, las dos cepas se aislaron con una diferencia de 21 días. Por otro lado, el patrón 44 incluyó cepas recogidas el mismo día, pero con diferencias en el perfil de resistencia antimicrobiana, específicamente a penicilina, eritromicina y cotrimoxazol.

Los patrones de PFGE 4, 7, 24 y 27 incluyeron cepas que pertenecen a diferentes pacientes y muestran un patrón de bandas igual o muy similar, lo que podría sugerir la existencia de una posible transmisión. Por este motivo, con el apoyo de personal de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, se buscó una relación epidemiológica que pudiera explicar el alto porcentaje de similitud entre esas cepas. Se revisaron datos de

los pacientes relacionados con la hospitalización como el número de la sala de cirugía, personal asistente durante los actos quirúrgicos, y antecedentes. A pesar de una búsqueda exhaustiva, no se encontraron datos clínicos ni epidemiológicos que confirmasen la posibilidad de una transmisión cruzada entre diferentes pacientes.

Por último, decir que no se encontraron patrones de PFGE compartidos entre las dos poblaciones de cepas (IPA y CQ). Las únicas agrupaciones que se generaron incluyeron solo cepas de IPA, todas las cepas CQ mostraron patrones únicos.



CEPA	ST	PATRÓN PFGE	FECHA	PACIENTE
IPA39	640	1	18/04/2016	
IPA47	2	2	13/09/2017	
IPA45	640	3	01/12/2016	
IPA27	2	4	02/04/2015	P1
IPA41	2		01/08/2016	P2
IPA28	2	5	19/10/2015	
IPA46	798	6	21/12/2016	
IPA04	2	7	02/07/2013	P3
IPA07	2		26/11/2013	P4
CQ08	796	8	15/03/2018	
IPA56	2	9	08/11/2018	
IPA57	2	10	13/02/2019	
CQ15	909	11	16/05/2019	
IPA50	57	12	04/01/2018	
CQ14	166	13	06/03/2019	
IPA05	657	14	22/07/2013	
CQ13	19	15	25/10/2018	
CQ06	89	16	30/11/2017	
CQ07	799	17	20/12/2017	
IPA03	23	18	02/02/2015	
IPA48	171	19	22/11/2017	
IPA06	658	20	06/03/2014	
CQ12	190	21	25/10/2018	
CQ16	297	22	11/07/2019	
IPA54	2	23	19/06/2018	
IPA09	2	24	14/12/2015	P5
IPA36	2		09/10/2015	P5
IPA37	2		09/06/2016	P5
IPA38	2		14/12/2015	P6
IPA32	2		05/06/2015	P7
IPA31	2	25	05/06/2015	
CQ17	898	26	18/07/2019	
IPA40	2	27	26/05/2016	P8
IPA42	2		06/07/2016	P9
IPA15	2	28	05/02/2014	P10
IPA16	2		26/02/2014	P10
IPA52	87	29	15/05/2018	
IPA53	5	30	07/05/2018	
CQ11	657	31	14/06/2018	
IPA55	5	32	24/10/2018	
IPA58	87	33	06/03/2019	
IPA12	35	34	10/10/2013	
CQ10	795	35	09/05/2018	
CQ09	800	36	12/04/2018	
IPA26	5	37	03/01/2015	
IPA29	5	38	06/06/2015	
IPA35	5	39	08/10/2015	
IPA22	659	40	11/05/2015	
IPA18	2	41	08/04/2014	
IPA51	2	42	03/05/2018	
IPA49	2	43	22/11/2017	
IPA23	640	44	05/11/2014	P11
IPA25	640		05/11/2014	P11
CQ03	297	45	15/02/2017	
CQ04	17	46	13/07/2017	
CQ05	88	47	20/09/2017	
IPA24	87	48	17/11/2014	
CQ02	32	49	27/10/2016	
IPA08	699	50	05/12/2013	
CQ01	35	51	27/10/2016	
IPA44	5	52	01/12/2016	
IPA02	23	53	02/02/2015	
IPA20	280	54	08/08/2014	
IPA21	10	55	17/10/2014	
IPA17	640	56	13/03/2014	
IPA34	640	57	03/08/2015	
IPA01	789	58	13/09/2013	

**Figura 34.** Dendrograma de las cepas de *S. epidermidis*. En recuadro: patrones de PFGE que incluyen de 2-6 cepas. Las cepas incluidas en el mismo patrón de PFGE, aisladas del mismo paciente y en la misma fecha, tuvieron un perfil de sensibilidad antimicrobiana diferente. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico.

## 5.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

La tipificación de secuencias multilocus, en inglés *Multilocus sequence typing* (MLST), determinó 54 secuenciotipos diferentes de un total de 117 cepas (Figura 34, Figura 35 y Figura 36). En este estudio se identificaron por primera vez 24 STs nuevos y, se obtuvieron 14 nuevos alelos (Tabla 31).

**Tabla 31.** Secuenciotipos y alelos nuevos descritos en este estudio.

Cepa	Población	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyrR</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqjL</i>	ST
IPA01	IPA	28	1	5	5	11	4	4	789
IPA05	IPA	1	1	2	1	1	1	15	657
IPA06	IPA	1	5	2	6	2	1	17	658
IPA08	IPA	1	1	6	2	2	1	3	699
IPA17	IPA	28	3	13	5	8	9	11	640
IPA22	IPA	7	1	53	2	4	1	1	659
IPA23	IPA	28	3	13	5	8	9	11	640
IPA25	IPA	28	3	13	5	8	9	11	640
IPA34	IPA	28	3	13	5	8	9	11	640
IPA39	IPA	28	3	13	5	8	9	11	640
IPA45	IPA	28	3	13	5	8	9	11	640
IPA46	IPA	8	69	17	4	9	6	36	798
PS04A2	PS	1	1	2	2	2	1	14	707
PS07	PS	1	63	7	6	2	1	33	722
PS08A2	PS	49	1	15	5	11	51	4	742
PS11	PS	1	1	2	2	3	52	3	746
PS21	PS	12	1	68	5	6	34	8	747
PS25	PS	12	1	9	8	7	5	27	790
PS27	PS	1	1	69	1	1	1	14	748
PS31	PS	1	2	2	46	2	1	3	749
PS38A1	PS	1	1	2	2	2	1	10	794
PS38A2	PS	12	1	5	5	3	4	11	795
PS40	PS	1	53	2	1	2	1	66	837
CQ7	CQ	1	67	2	1	2	1	7	799
CQ8	CQ	3	1	5	5	7	5	4	796
CQ9	CQ	1	68	7	6	2	1	33	800
CQ10	CQ	12	1	5	5	3	4	11	795
CQ15	CQ	1	1	2	1	2	62	1	909
CQ17	CQ	3	1	5	5	7	4	4	898

En azul: secuenciotipos y alelos nuevos. IPA: infección de prótesis articular, PS: personas sanas, CQ: campo quirúrgico.

Como podemos observar en la Figura 35, en las cepas IPA predomina el ST2, que estuvo presente en el 44% de los casos (22/50), seguido



del nuevo ST640 y ST5 (6/50; 12% ambos), ST87 (3/50; 6%) y ST23 (2/50; 4%). Contrariamente, en las cepas PS y CQ se encontró una gran variabilidad de STs, sin ningún ST predominante.

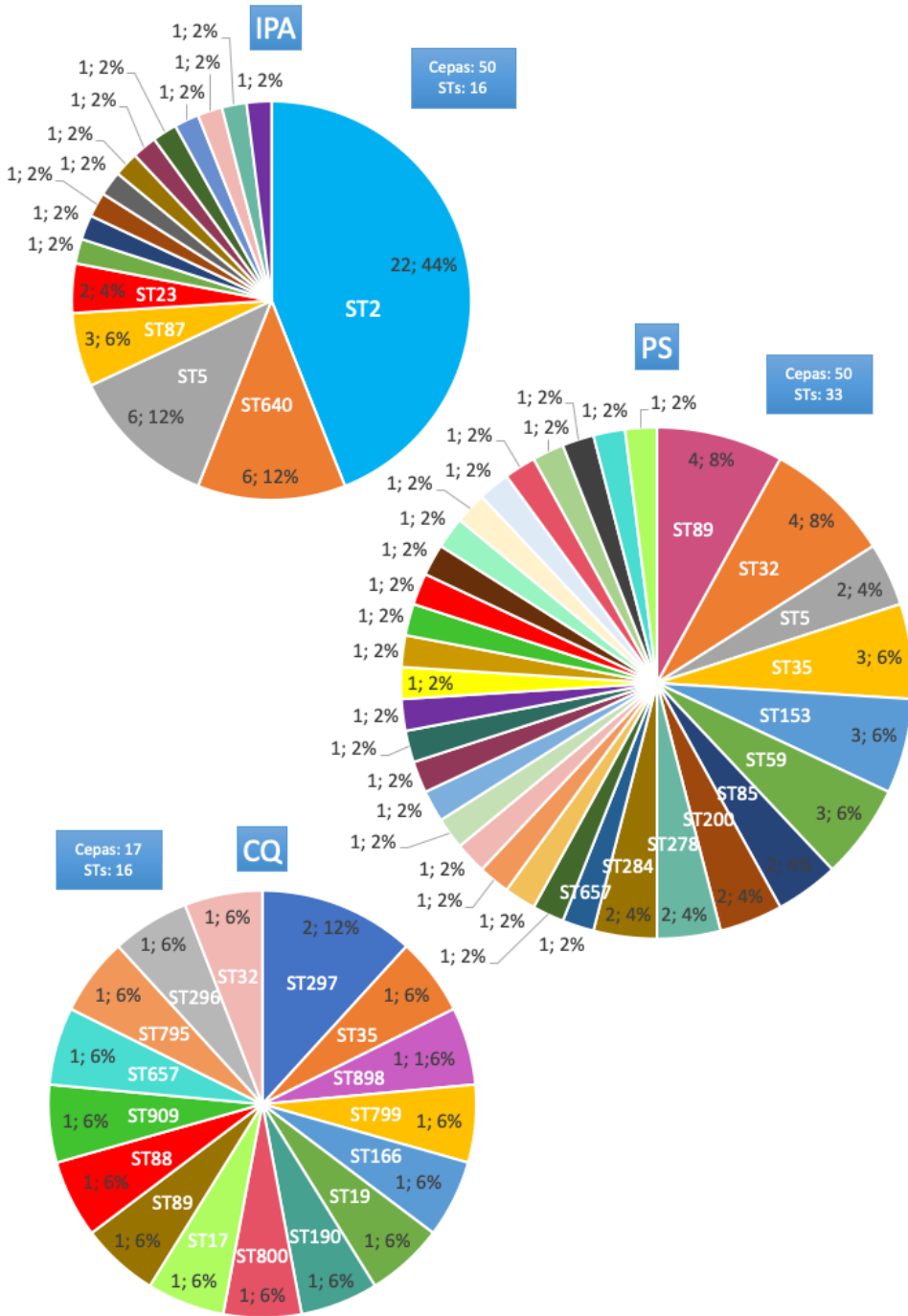
En las cepas PS, los STs más comunes fueron ST89 y ST32 (4/50; 8% ambos), ST35, ST153 y ST59 (3/50; 6% cada ST), ST5, ST85, ST200, ST278, ST284, ST657 (2/50; 4% cada ST).

En el caso de las cepas CQ, las 17 cepas incluidas presentaron un ST diferente, con excepción de dos cepas: ST17, ST19, ST32, ST35, ST88, ST89, ST166, ST190, ST297 (2 cepas), ST657, ST795, ST796, ST799, ST800, ST898, ST909. En ninguna de estas dos poblaciones de cepas (PS y CQ) se encontró el ST2, que fue el predominante de las cepas IPA.

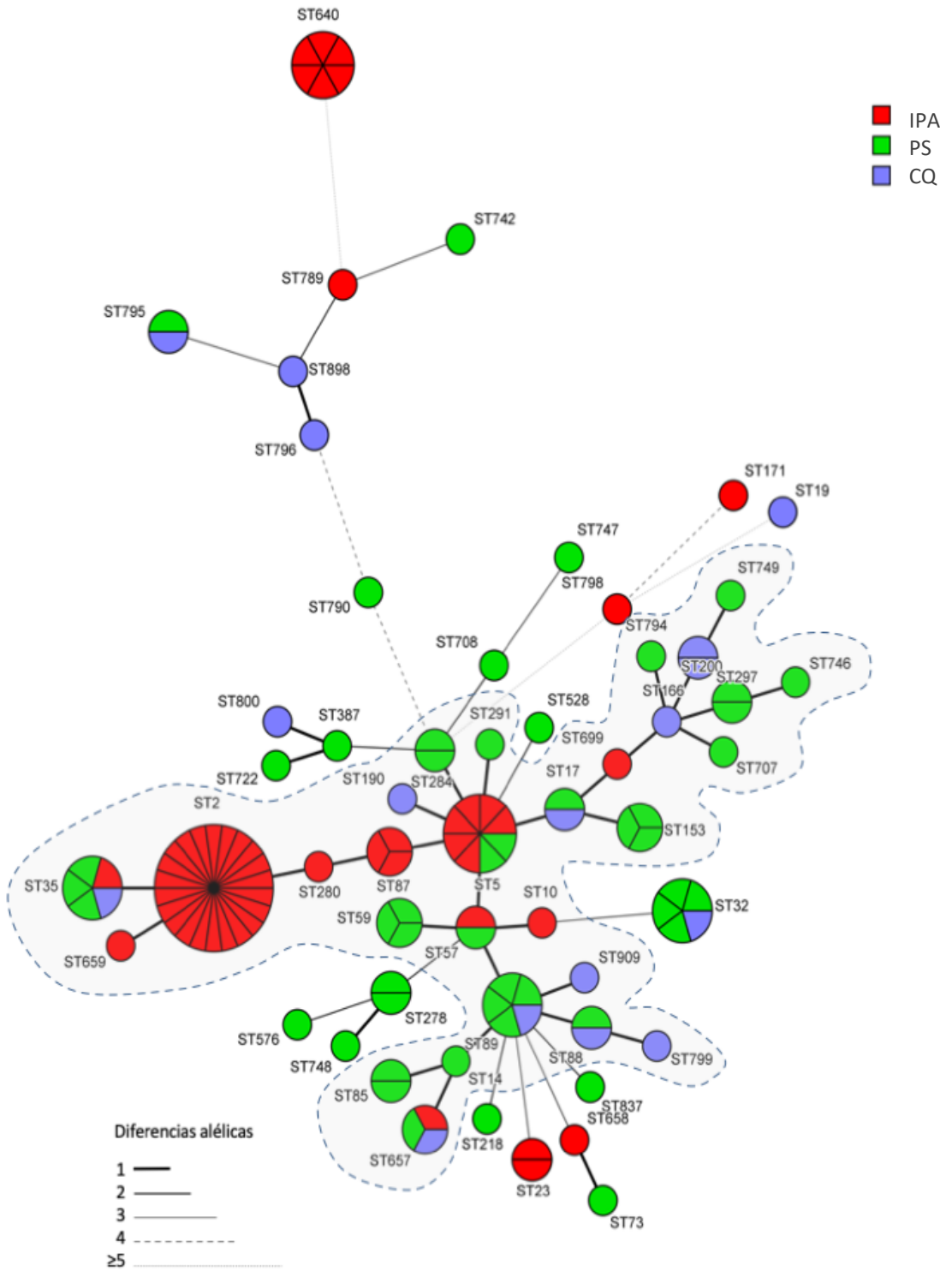
También se observó exclusividad de algunos STs en las poblaciones de cepas:

- En las cepas **IPA** estuvieron presentes los secuenciotipos: ST2, ST10, ST23, ST87, ST171, ST280, ST640, ST658, ST659, ST699, ST789 y ST794, los cuales no se encontraron en las otras dos poblaciones de cepas.
- En las cepas **PS**: ST14, ST59, ST73, ST85, ST153, ST166, ST200, ST218, ST278, ST284, ST291, ST387, ST528, ST576, ST707, ST708, ST722, ST742, ST746, ST747, ST748, ST749, ST790, y ST837.
- En las cepas **CQ**: ST19, ST166, ST190, ST796, ST297, ST799, ST800, ST898 y ST909.

En la agrupación de todos los STs en el árbol de expansión mínima, en inglés *minimum spanning tree* (MST) (Figura 36), podemos observar que se compartieron STs entre las tres poblaciones de cepas o combinaciones de dos poblaciones (IPA-PS y PS-CQ). Los secuenciotipos ST35 y ST657 se encontraron presentes en las tres poblaciones de cepas. Los secuenciotipos ST5 y ST57 estuvieron presentes en cepas IPA y PS. Los secuenciotipos ST17, ST32, ST88, ST89 y ST795, en cepas PS y CQ. Y por último, las cepas IPA y las cepas CQ no tuvieron ningún ST en común.



**Figura 35.** Distribución de los secuenciotipos (STs) en las 3 poblaciones de *S. epidermidis*. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas.



**Figura 36.** Arbol de expansión mínima (*minimum spanning tree*-MST) de todas las cepas de *S. epidermidis*. El MST fue construido mediante Bionumerics v7.6. El tipo de línea que une las diferentes STs indica la diferencia alélica entre ellos (1, 2, 3, 4,  $\geq 5$ ). El tamaño de cada círculo representa un ST escalado al número de cepas que incluye. Dentro de las líneas suspensivas se muestran los STs incluidos en el complejo clonal CC2 mediante eBURST. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas.

Mediante el software eBURST, se pudieron agrupar los diferentes STs en complejos clonales (CCs) (Tabla 32): 38 STs se agruparon en cinco CCs y 16 STs fueron singletons. Los STs se agrupan en un mismo CC cuando hay una diferencia de un alelo entre ellos, que se indica en la Figura 36 como la línea con más grosor. Con el software eBURST no se logró definir el número de CC, sólomente realizó las agrupaciones correspondientes, ya que en la base de datos de pubmlst (<https://pubmlst.org/sepidermidis/>) no están descritos los CCs de *S. epidermidis*.

Teniendo en cuenta esta limitación para la asignación de los CCs, se tuvo en cuenta la bibliografía publicada<sup>63,103,104</sup>. De esta forma, solo fue posible definir el número de CC de uno de los grupos (indicado como grupo 1 en la Tabla 32), el cual incluyó la mayoría de cepas (80/117; 68,4%). El grupo 1 correspondió al complejo clonal 2 (CC2), el más conocido y más común en *S. epidermidis*. Dentro del CC2, se dividieron los STs en dos subgrupos (Tabla 33): el subgrupo CC2-I, el

cual incluye el ST2 que fue predominante en IPA ( $p < 0,05$ ) y el ST35; y el subgrupo CC2-II, que incluye los secuenciotipos ST5, ST10, ST14, ST17, ST57, ST59, ST85, ST87, ST88, ST89 y ST153. Aparte de este CC, no fue posible definir el número para otros posibles complejos clonales.

**Tabla 32.** Agrupaciones de los secuenciotipos del estudio mediante eBURST.

Grupo	n STs (n cepas)	STs (n cepas)
<b>1 (CC2)</b>	29 (80)	2 (22), 5 (8), 10 (1), 14 (1), 17 (2), 35 (5), 57 (2), 59 (3), 85 (2), 87 (3), 88 (2), 89 (5), 153 (3), 166 (1), 190 (1), 200 (2), 280 (1), 284 (2), 291 (1), 297 (2), 657 (3), 659 (1), 699 (1), 707 (1), 746 (1), 749 (1), 794 (1), 799 (1), 909 (1)
<b>2</b>	3 (3)	387 (1), 722 (1), 800 (1)
<b>3</b>	2 (3)	278 (2), 748 (1)
<b>4</b>	2 (2)	73 (1), 658 (1)
<b>5</b>	2 (2)	796 (1), 898 (1)
<b>Singletons</b>	16 (27)	19 (1), 23 (2), 32 (5), 171 (1), 218 (1), 528 (1), 576 (1), 640 (6), 708 (1), 742 (1), 747 (1), 789 (1), 790 (1), 795 (2), 798 (1), 837 (1)

**Tabla 33.** Clasificación de los secuenciotipos en el complejo clonal 2 (CC2), según la población de cepas de *S. epidermidis*.

Complejo clonal (CC)	STs incluidos	IPA (n=50) n (%)	CQ (n=17) n (%)	PS (n=50) n (%)
<b>CC2-I*</b>	ST2 y ST35	23 (46)	1 (5,9)	3 (6)
<b>CC2-II</b>	ST5, ST10, ST14, ST17, ST57, ST59, ST85, ST87, ST88, ST89 y ST153	11 (22)	3 (17,6)	18 (36)
<b>Restantes</b>	ST32, ST73, ST171, ST200, ST218, ST278, ST280, ST284, ST291, ST297, ST387, ST528, ST576, ST640, ST657, ST658, ST659, ST699, ST707, ST708, ST722, ST742, ST746, ST747, ST748, ST749, ST789, ST790, ST794, ST795, ST796, ST798, ST799, ST800, ST837	16 (32)	13 (76,5)	29 (58)

CC: complejo clonal, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: individuos sanos. \* Valor  $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas entre las 3 poblaciones de cepas.

Analizando en conjunto los resultados de clonalidad de las cepas de *S. epidermidis* mediante PFGE y MLST, encontramos una gran diversidad tanto de patrones de PFGE como de STs. Sin embargo, las poblaciones de cepas no se han distribuido separadamente en el MST, si no que se encuentran mezcladas. Como se ha mencionado,

el ST2 fue prevalente en las cepas IPA, y está presente en casi todos los posibles clones definidos en el PFGE (Figura 34).

## 5.7. Análisis filogenético de las cepas con ST2

Con el objetivo de estudiar con mayor profundidad las 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 aisladas de IPA, se analizaron por secuenciación del genoma completo (WGS). De esta manera se buscaba determinar relaciones filogenéticas y posibles casos de transmisión cruzada.

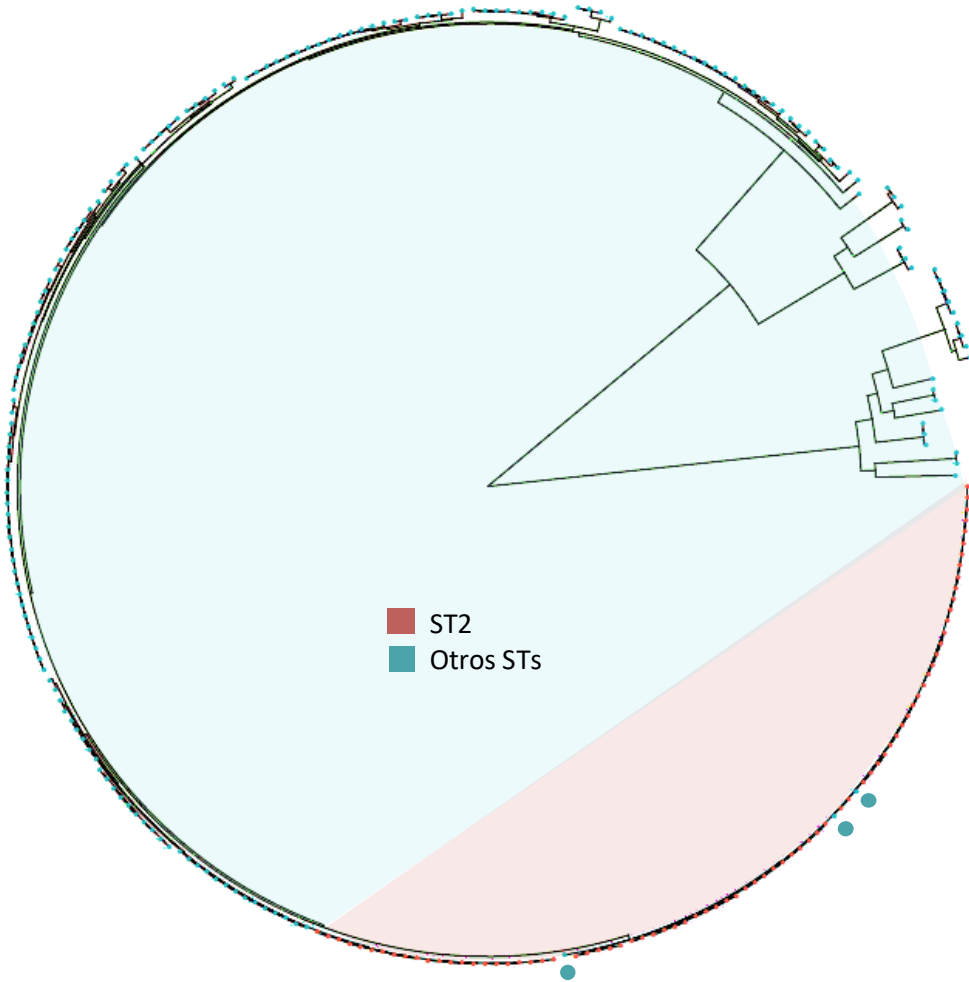
El análisis filogenético de las cepas se realizó mediante la construcción de árboles de máxima verosimilitud, en inglés *Maximum-likelihood* (ML). Para ello se realizaron los alineamientos del *core genome* de las cepas ST2 del estudio y otras cepas de referencia, las cuales se detallan en la descripción de cada árbol. El árbol fue generado por RaxML y las secuencias fueron filtradas eliminando las recombinaciones mediante Gubbins, teniendo en cuenta el cálculo de la diferencia de polimorfismo de nucleótido único, en inglés *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs), existente entre las cepas.



Después de aplicar estos pasos en el análisis, se construyeron tres árboles:

- Árbol 1: 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 241 cepas de *S. epidermidis* de varios STs del estudio de Méric *et al.* <sup>113</sup> y la cepa de referencia *S. epidermidis* BPH0662 (Figura 37).
- Árbol 2: 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 59 cepas de *S. epidermidis* ST2 del estudio de Méric *et al.*, y la cepa de referencia *S. epidermidis* BPH0662 (Figura 38).
- Árbol 3: 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y la cepa de referencia *S. epidermidis* BPH0662 (Figura 39).

En el árbol 1 (Figura 37), se observa la distribución filogenética de 264 cepas de *S. epidermidis*. Las cepas pertenecientes al ST2 (indicadas en rojo) se localizan conjuntamente en el árbol, con una clara separación del resto de cepas pertenecientes a otros STs (indicadas en azul). En excepción, se incluyen entre las cepas ST2, tres cepas con tres STs diferentes (ST168, ST188 y ST5), las cuales difieren del ST2 en uno, uno y tres alelos, respectivamente.

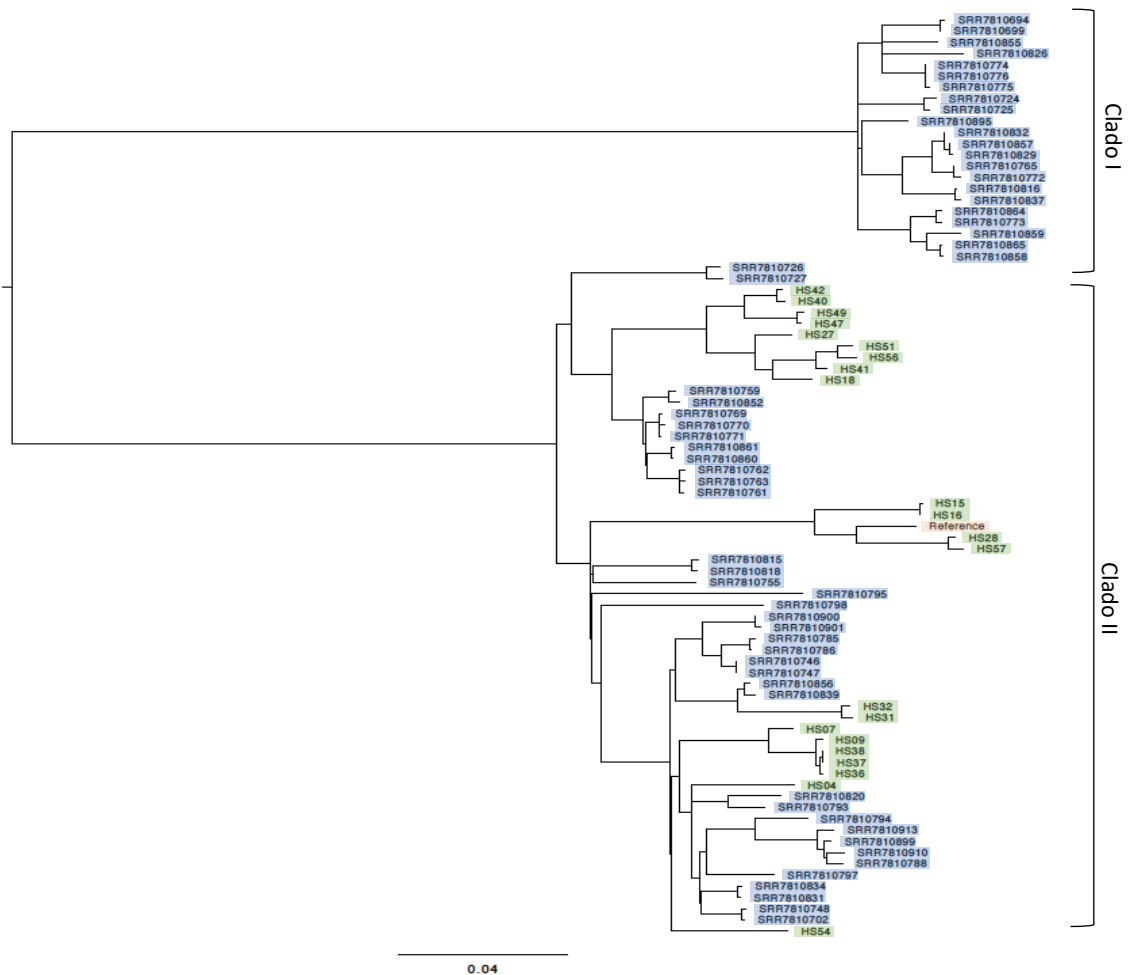


**Figura 37.** Árbol filogenético circular (número 1). Incluye 264 cepas de *S. epidermidis* reconstruido mediante una aproximación del algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*- ML) con datos del análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). El árbol fue generado por RaxML incorporado en Gubbins, basado en la alineación del genoma central con la eliminación de las regiones recombinantes. Se evaluaron los patrones de ramificación por *bootstrapping* (1.000 repeticiones).

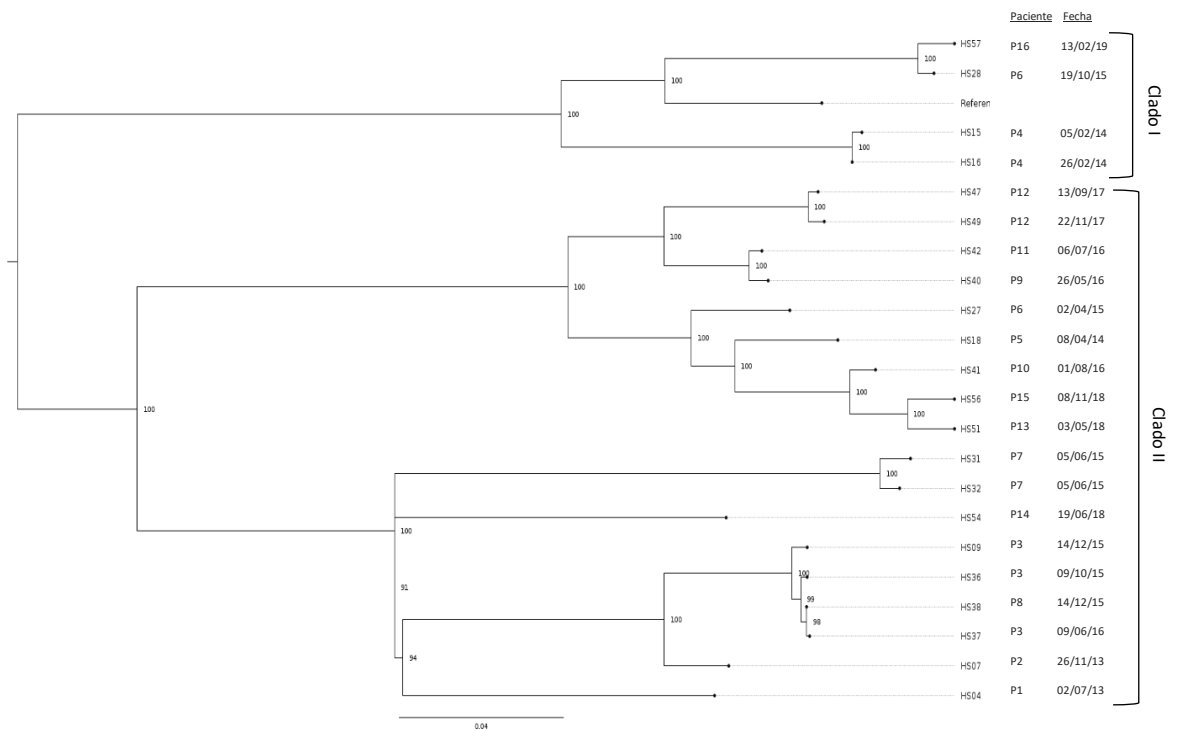
En el árbol 2 (Figura 38), se distribuyen filogenéticamente 81 cepas de *S. epidermidis* ST2. Se observa una división en dos clados, el primero de ellos (n=22) incluye solamente cepas del estudio de Méric *et al.*<sup>113</sup>, y el segundo clado (n=59), incluye una mezcla de las cepas de ambos estudios. A pesar de aislarse en diferentes sitios geográficos, las cepas del presente estudio se distribuyen junto con las del estudio de Méric *et al.*<sup>113</sup>, sin observarse una división entre ellas.

En el árbol 3 (Figura 39), se muestra la filogenia de las 22 cepas ST2 de nuestro estudio junto con la cepa de referencia. Se puede observar una división en dos clados: el clado I agrupa solamente cinco cepas y el clado II la mayoría de cepas (n=18).

Más adelante, analizaremos con más profundidad la relación clonal y los posibles eventos de transmisión entre las cepas.



**Figura 38.** Árbol filogenético (número 2). Incluye 81 cepas de *S. epidermidis* ST2 reconstruido mediante una aproximación del algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*- ML) con datos del análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). El árbol fue generado por RaxML incorporado en Gubbins, basado en la alineación del genoma central con la eliminación de las regiones recombinantes. La barra de escala representa distancias genéticas basadas en sustituciones de nucleótidos por SNP. Se evaluaron los patrones de ramificación por *bootstrapping* (1.000 repeticiones). En verde: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en azul: otro estudio <sup>113</sup>, en naranja: cepa de referencia *S. epidermidis* BPH0662.



**Figura 39.** Árbol filogenético (número 3). Incluye 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 (del presente trabajo), reconstruido mediante una aproximación del algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum likelihood- ML*) con datos del análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). El árbol fue generado por RaxML incorporado en Gubbins, basado en la alineación del genoma central con la eliminación de las regiones recombinantes. Los valores indicados en los nodos corresponden al valor de *bootstrapping* (1.000 permutaciones). Reference: genoma de referencia *S. epidermidis* BPH0662.

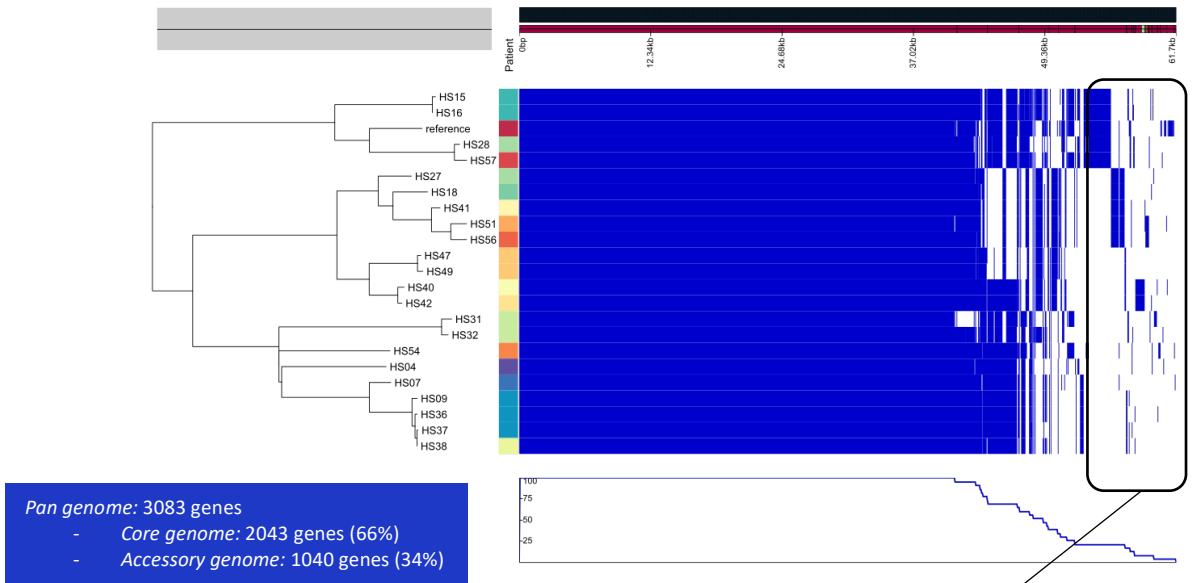
Adicionalmente, se realizó el análisis del *core genome* y el genoma accesorio (*accessory genome*) de las cepas ST2 de *S. epidermidis* de nuestro hospital. El análisis fue realizado con Roary v3.13 y

visualizado con la aplicación web interactiva Phandango (Figura 40). Se consideraron dos genes iguales cuando compartían más del 95% de identidad.

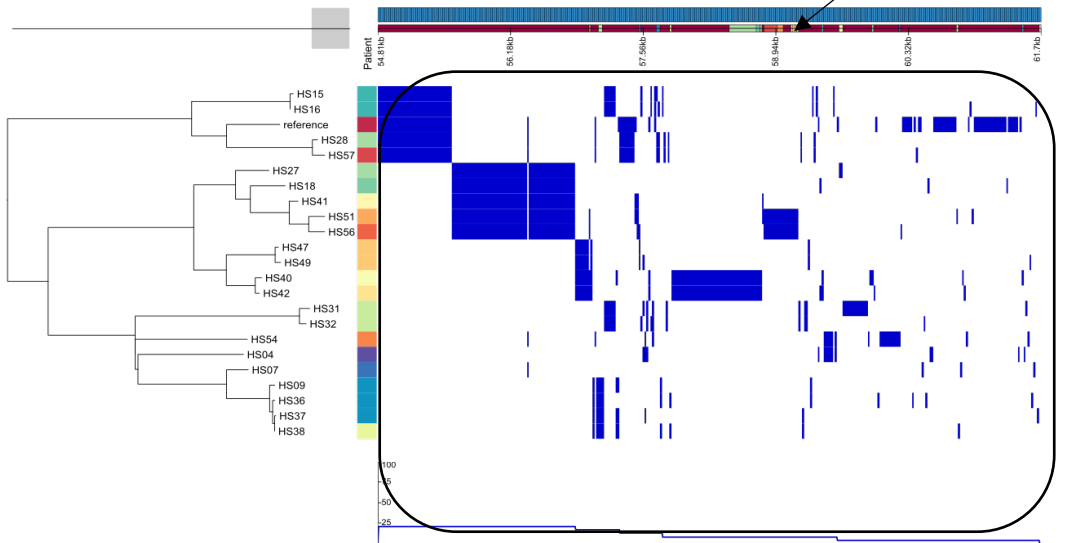
El 99%-100% de las cepas compartieron 2043 genes de un total de 3083 genes, es decir, el 66% del genoma fue idéntico en todas las cepas (*core genome*).

En cuanto al genoma accesorio, incluyó 1040 genes variables (34%). Se pudo observar que a nivel de *core genome* las cepas son muy parecidas, y como era de esperar, existen diferencias a nivel del genoma accesorio, aunque sean mínimas en cepas estrechamente relacionadas. Esto puede indicarnos que las cepas incluidas en los *clusters* no son completamente idénticas.

A



B



**Figura 40.** Análisis del *core genome* y *accessory genome* de las cepas de *S. epidermidis* ST2. A. Visualización en Phandango del *core genome* (2043 genes) y *accessory genome* (1040 genes) determinados por Roary. B. Visualización en Phandango del *accessory genome* determinado por Roary. Se consideraron dos genes iguales cuando compartían más del 95% de identidad.

### 5.7.1. Análisis para definir posibles transmisiones

Con el objetivo de definir la existencia de posibles *clusters* de transmisión en las cepas de *S. epidermidis* ST2 de nuestro hospital, se realizó el análisis de Polimorfismo de Nucleótidos Simple, en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Para el análisis, se mapearon los *reads* a la secuencia del genoma de referencia *S. epidermidis* BPH0662 (NZ\_LT571449.1), la cual pertenece al ST2.

Teniendo en cuenta que no hay un umbral definido para el análisis de SNPs en estafilococos, se han tenido en cuenta varias publicaciones: el umbral de relación en *S. aureus* que se recomienda actualmente está en  $\leq 15$  SNPs <sup>123</sup>, en acorde con la máxima variación ( $\leq 40$  SNPs) en un mismo huésped <sup>124</sup>. En este estudio hemos considerado analizar, de manera desescalada, diferentes umbrales de SNPs (100, 50, 25, 20, 17, 15, 12, 10, 5 y  $\leq 2$  SNPs), y paralelamente, revisar los datos epidemiológicos.

A continuación, se detalla el análisis de los genomas bacterianos de *S. epidermidis* ST2 mediante el número descendente de SNPs (Tabla 34) (Ver Anexo VI):

- **100 SNPs:** se generaron siete *clusters* (I-VII) y dos patrones únicos. El *cluster* I incluyó cinco cepas (tres cepas de un mismo paciente y las otras dos cepas de pacientes diferentes), con un



tiempo de aislamiento entre ellas de entre más de dos años y medio; el *cluster V* incluyó cuatro cepas (dos cepas de un mismo paciente, dos cepa de pacientes diferentes), con un tiempo de aislamiento entre ellas de un año y medio; el *cluster III* incluyó tres cepas, cada una de pacientes diferentes, con un tiempo de aislamiento entre ellas de más de dos años; los *clusters II* y *VII* incluyeron dos cepas del mismo paciente y los *clusters IV* y *VI* incluyeron dos cepas de diferentes pacientes. Las cepas del *cluster II* se aislaron el mismo día, el *cluster VII* tiene un tiempo de aislamiento entre ellas de 21 días, el *cluster IV* de un año y el *cluster VI* de más de tres años.

- **50 SNPs:** no hubo diferencia en el número de *clusters*, pero si en el número de cepas que los constituyen, ya que se generaron siete *clusters* y cinco patrones únicos. Los cambios se produjeron en el *cluster I*, el cual incluye cuatro cepas en lugar de cinco (se mantienen las tres cepas de un mismo paciente y una cepa de otro paciente), las cepas del *cluster V* del análisis de 100 SNPs, ahora están separadas en los *clusters IV* (nuevo) y *V*. El *cluster IV* incluye dos cepas de pacientes diferentes con 41 días de diferencia en su aislamiento, y el *cluster V* incluye dos cepas de un mismo paciente que se aislaron con más de dos meses de diferencia. Los *clusters VI* y *VII* se mantienen iguales que en el análisis a 100 SNPs.

- **25 SNPs:** disminuyó el número de *clusters* de siete a seis y aumentó el número de patrones únicos de cinco a ocho. Todos los *clusters* se mantuvieron iguales que con el análisis a 50 SNPs, excepto el *cluster* III, que se desagrupó en tres patrones únicos.
- **20 SNPs:** no se produjo ningún cambio con respecto al análisis a 25 SNPs (seis *clusters* y ocho patrones únicos).
- **17 SNPs:** se generaron cinco *clusters* y 10 patrones únicos. Los *clusters* I, II, IV, V y VII se mantuvieron igual. El *cluster* VI se desagrupó en 2 patrones únicos.
- **15 SNPs:** el número de *clusters* disminuyó de cinco a cuatro y aumentaron los patrones únicos de 10 a 12. Se mantuvieron los *clusters* I, IV, V y VII y el *cluster* II se desagrupó.
- **12 SNPs:** no se produjo ningún cambio con respecto al análisis a 15 SNPs.
- **10 SNPs:** se redujo el número de *clusters* a tres, y los patrones únicos aumentaron a 15. Del *cluster* I se separó la cepa HS09 (perteneciente a un mismo paciente), y el *cluster* IV se desagrupó en 2 patrones únicos.
- **5 SNPs:** se mantienen sólo dos *clusters* y hay 17 patrones únicos. El *cluster* V se desagrupó en 2 patrones únicos. El *cluster* I se

mantiene con dos cepas de un mismo paciente y otra de otro paciente, y el *cluster* VII con dos cepas del mismo paciente.

- **2 SNPs:** únicamente queda agrupado el *cluster* I con las cepas HS37 y HS38 (de diferente paciente), la cepa HS36 queda desagrupada, y 20 patrones únicos. El *cluster* VII se desagrupa.

**Tabla 34.** Análisis de SNPs: *Clusters* generados según la diferencia de SNPs en *S. epidermidis*.

SNPS	Patrones únicos	Clusters nº	Clusters	Cepas nº	Cepa	Fecha	Paciente	Patrón PFGE
<b>100</b>	2	7	I	5	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
					HS09	14/12/15	P3	24
					HS07	26/11/13	P2	24
			II	2	HS32	5/6/15	P7	24
					HS31	5/6/15	P7	25
			III	3	HS56	8/11/18	P15	9
					HS51	3/5/18	P13	42
					HS41	1/8/16	P10	4
			IV	2	HS18	8/4/14	P5	41
					HS27	2/4/15	P6	4
			V	4	HS42	6/7/16	P11	27
					HS40	26/5/16	P9	27
					HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VI	2	HS57	13/2/19	P16	10
					HS28	19/10/15	P6	5
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>50</b>	5	7	I	4	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
					HS09	14/12/15	P3	24
					HS32	5/6/15	P7	24
			II	2	HS32	5/6/15	P7	24

					HS31	5/6/15	P7	25
			III	3	HS56	8/11/18	P15	9
					HS51	3/5/18	P13	42
					HS41	1/8/16	P10	4
			IV	2	HS42	6/7/16	P11	27
			(nuevo)		HS40	26/5/16	P9	27
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VI	2	HS57	13/2/19	P16	10
					HS28	19/10/15	P6	5
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>25</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	I	4	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
					HS09	14/12/15	P3	24
			II	2	HS32	5/6/15	P7	24
					HS31	5/6/15	P7	25
			IV	2	HS42	6/7/16	P11	27
					HS40	26/5/16	P9	27
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VI	2	HS57	13/2/19	P16	10
					HS28	19/10/15	P6	5
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>20</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	I	4	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
					HS09	14/12/15	P3	24
			II	2	HS32	5/6/15	P7	24
					HS31	5/6/15	P7	25
			IV	2	HS42	6/7/16	P11	27
					HS40	26/5/16	P9	27
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VI	2	HS57	13/2/19	P16	10
					HS28	19/10/15	P6	5
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>17</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	I	4	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24

					HS09	14/12/15	P3	24
			II	2	HS32	5/6/15	P7	24
					HS31	5/6/15	P7	25
			IV	2	HS42	6/7/16	P11	27
					HS40	26/5/16	P9	27
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>15</b>	12	4	I	4	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
					HS09	14/12/15	P3	24
			IV	2	HS42	6/7/16	P11	27
					HS40	26/5/16	P9	27
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>12</b>	12	4	I	4	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
					HS09	14/12/15	P3	24
			IV	2	HS42	6/7/16	P11	27
					HS40	26/5/16	P9	27
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>10</b>	15	3	I	3	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
			V	2	HS49	22/11/17	P12	43
					HS47	13/9/17	P12	2
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>5</b>	17	2	I	3	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24
					HS36	9/10/15	P3	24
			VII	2	HS16	26/2/14	P4	28
					HS15	5/2/14	P4	28
<b>2</b>	20	1	I	2	HS38	14/12/15	P8	24
					HS37	9/6/16	P3	24

También se construyó una matriz de SNPs de alineamiento por parejas a partir del árbol filogenético, la cual muestra las diferencias de SNPs entre cada una de las cepas incluidas (Figura 41). El enfoque basado en SNPs en nuestro conjunto de datos determinó un rango de distancia de SNPs por pares de 1 a 540 SNPs. La diferencia mínima de 1 SNP se observó entre las cepas HS37 y HS38 y la diferencia máxima de 540 SNPs entre las cepas HS51 y HS57.

	HS04	HS07	HS09	HS15	HS16	HS18	HS27	HS28	HS31	HS32	HS36	HS37	HS38	HS40	HS41	HS42	HS47	HS49	HS51	HS54	HS56	HS57	Ref.
HS04	0	198	221	427	430	386	370	463	263	258	218	217	217	361	397	358	379	379	418	200	422	469	436
HS07	198	0	67	426	424	388	371	459	264	262	69	69	68	365	397	363	384	384	423	211	424	467	433
HS09	221	67	0	449	448	406	390	480	287	286	11	11	9	383	415	380	401	402	441	236	442	488	450
HS15	427	426	449	0	3	472	458	207	432	432	448	445	445	448	476	446	459	461	499	435	505	218	180
HS16	430	424	448	3	0	470	455	206	429	430	446	444	444	448	473	446	458	459	500	434	502	217	177
HS18	386	388	406	472	470	0	80	501	426	426	403	401	402	154	77	153	168	170	102	376	105	506	466
HS27	370	371	390	458	455	80	0	487	414	411	386	385	385	136	91	135	151	152	116	364	117	492	452
HS28	463	459	480	207	206	501	487	0	467	468	478	476	477	483	507	481	494	497	533	461	533	18	138
HS31	263	264	287	432	429	426	414	467	0	17	288	287	286	415	438	413	426	426	466	265	465	474	438
HS32	258	262	286	432	430	426	411	468	17	0	284	282	282	408	436	406	422	422	464	259	464	474	435
HS36	218	69	11	448	446	403	386	478	288	284	0	4	4	379	412	376	397	398	438	229	440	486	448
HS37	217	69	11	445	444	401	385	476	287	282	4	0	1	378	411	375	396	397	437	227	439	483	446
HS38	217	68	9	445	444	402	385	477	286	282	4	1	0	379	411	375	396	397	438	229	440	485	447
HS40	361	365	383	448	448	154	136	483	415	408	379	378	379	0	163	11	85	85	187	364	190	489	449
HS41	397	397	415	476	473	77	91	507	438	436	412	411	411	163	0	162	177	179	42	390	43	513	472
HS42	358	363	380	446	446	153	135	481	413	406	376	375	375	11	162	0	83	83	186	362	189	487	447
HS47	379	384	401	459	458	168	151	494	426	422	397	396	396	85	177	83	0	9	201	369	205	500	459
HS49	379	384	402	461	459	170	152	497	426	422	398	397	397	85	179	83	9	0	203	376	206	502	461
HS51	418	423	441	499	500	102	116	533	466	464	438	437	438	187	42	186	201	203	0	417	31	540	498
HS54	200	211	236	435	434	376	364	461	265	259	229	227	229	364	390	362	369	376	417	0	416	472	437
HS56	422	424	442	505	502	105	117	533	465	464	440	439	440	190	43	189	205	206	31	416	0	539	497
HS57	469	467	488	218	217	506	492	18	474	474	486	483	485	489	513	487	500	502	540	472	539	0	144
Ref.	436	433	450	180	177	466	452	138	438	435	448	446	447	449	472	447	459	461	498	437	497	144	0

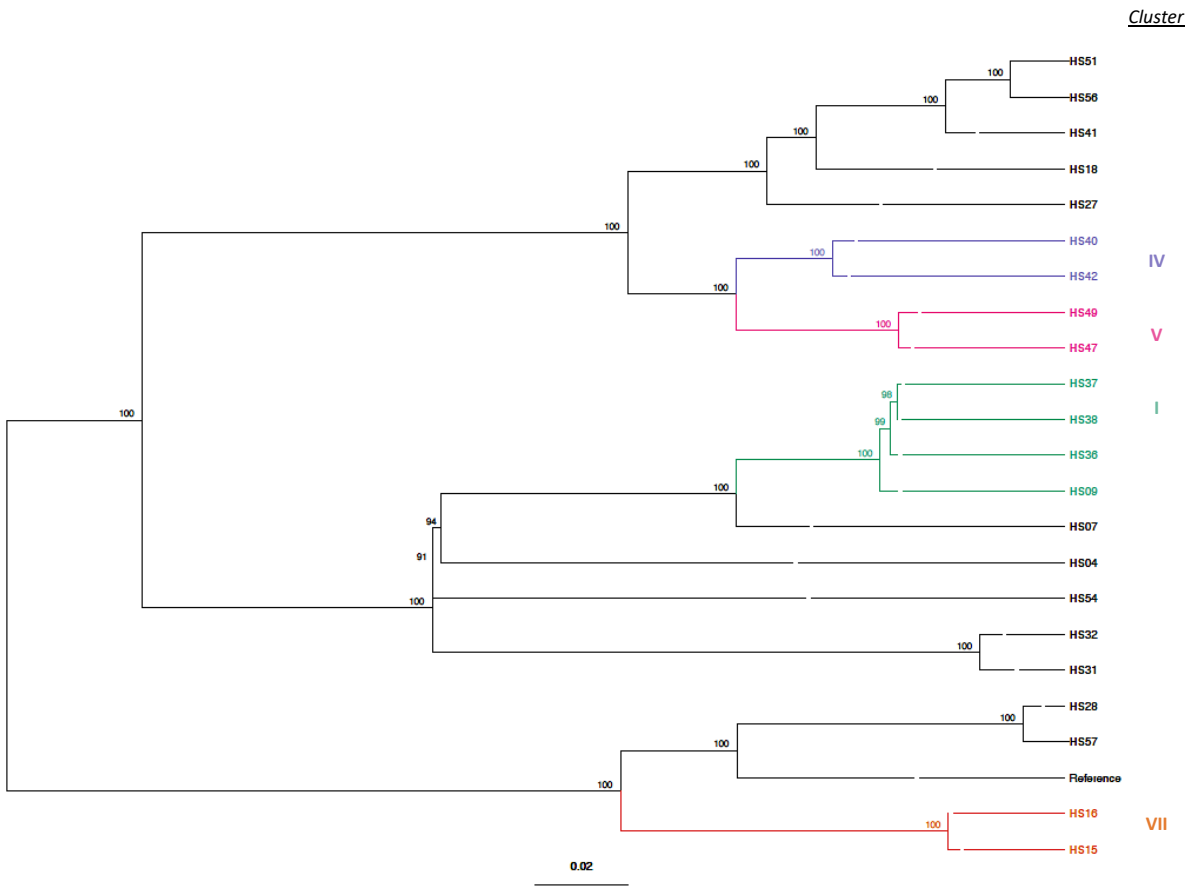
**Figura 41.** Matriz de SNPs de alineamiento por parejas. En azul: 10-15 SNPs de diferencia, en verde: 5-10 SNPs de diferencia, en amarillo: 5-2 SNPs de diferencia, en rosa:  $\leq 2$  SNPs.

Como hemos mencionado anteriormente, varios autores proponen actualmente el umbral de clonalidad de  $\leq 15$  SNPs en *S. aureus*<sup>123</sup>, sin embargo debe aplicarse con un grado de flexibilidad ya que aún no se ha establecido un punto de corte para definir una transmisión. Para analizar las posibles transmisiones, estudiaremos con más detenimiento las agrupaciones donde las cepas no diferían en más

de 15 SNPs, según las comparaciones del genoma central. En este paso se incluyeron datos relacionados con la hospitalización y algunas características de las cepas (fecha de aislamiento, paciente, tipo de prótesis, patrón PFGE, patrón de resistencia y diferencia de SNPs), para determinar los vínculos entre las cepas dentro de cada *cluster*. Los datos epidemiológicos (personal quirúrgico y sala de quirófano) ya fueron estudiados en el análisis de PFGE y no se encontró una relación espacio-tiempo en ningún caso.

Teniendo en cuenta el análisis a 15 SNPs de diferencia mostrado en la Tabla 34, a continuación, se detalla la distribución filogenética de los cuatro *clusters* (I, IV, V y VII) y 12 patrones únicos en el árbol filogenético de máxima verosimilitud indicado en la Figura 42:





**Figura 42.** Árbol filogenético de 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau reconstruido mediante una aproximación del algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*- ML) con datos del análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). El árbol fue generado por RaxML incorporado en Gubbins, basado en la alineación del genoma central con la eliminación de las regiones recombinantes. La barra de escala representa distancias genéticas basadas en sustituciones de nucleótidos por SNP. Los valores indicados en los nodos corresponden al valor de *bootstrapping* (1.000 permutaciones). Reference: genoma de referencia *S. epidermidis* BPH0662. En color: *clusters* generados en un umbral de  $\leq 15$  SNPs.

- **Cluster I:** incluye cuatro cepas, tres cepas de un mismo paciente, con prótesis de rodilla, con el mismo antibiograma (HS09, HS36 y HS37), y la otra cepa restante de un paciente diferente (HS38) con prótesis de cadera, que difiere en su patrón de resistencia a eritromicina y clindamicina, en comparación con las otras tres cepas. Las cuatro cepas pertenecieron al mismo patrón de PFGE (24). Se destaca la coincidencia en la fecha de aislamiento (14/12/2015) de dos de estas cepas (HS09 y HS38) que pertenecen a diferentes pacientes (Tabla 35). En cuanto a diferencia de SNPs, las cepas más cercanas son la HS37 y HS38 (de pacientes diferentes) difiriendo solamente en 1 SNP (Tabla 36). Es decir, cepas de diferentes pacientes con diferente antibiograma parecen estar más relacionadas que las cepas de un mismo paciente con el mismo antibiograma. Incluso, la cepa HS09, la más distante entre estas cuatro cepas, ha tenido menos diferencias de SNPs con la HS38 (9 SNPs) que con las cepas pertenecientes al mismo paciente (11 SNPs) (Tabla 36).
- **Cluster IV:** está compuesto por la cepa HS40, de un primer paciente, y por la cepa HS42, de un segundo paciente. Ambas coinciden en el tipo de prótesis (prótesis de cadera), en el patrón de resistencia (exceptuando el imipenem, una es sensible y la otra resistente) y las fechas de aislamiento son bastante cercanas (41 días de diferencia). Las cepas incluidas en este

*cluster* estuvieron separadas por 11 SNPs de diferencia y se agruparon en el mismo patrón de PFGE (27) (Tabla 35).

- **Cluster V:** compuesto por dos cepas (HS47 y HS49) de un mismo paciente, aisladas de prótesis de cadera, las cuales difieren en sus antibiogramas en la resistencia a penicilina, clindamicina y fosfomicina. Fueron cepas aisladas con una diferencia de 70 días y difirieron en 9 SNPs. Cabe destacar que estas cepas no coincidieron con los patrones de PFGE encontrados: la cepa HS47 se incluyó en el patrón de PFGE 2, y la cepa HS49 en el patrón de PFGE 43 (Tabla 35).
- **Cluster VII:** incluye dos cepas de un mismo paciente (HS15 y HS16), con el mismo antibiograma y con una diferencia de 21 días en la fecha de aislamiento. Las cepas se diferenciaron solamente por 3 SNPs y se agruparon en el mismo patrón de PFGE (28) (Tabla 35).

**Tabla 35.** Cepas de *S. epidermidis* ST2 en *clusters* con un umbral de  $\leq 15$  SNPs.

Cluster	Cepa	Fecha de aislamiento	Paciente	Tipo de prótesis	Patrón PFGE	Patrón de resistencia	Diferencia de SNPs
I	HS38	14/12/2015	P8	Cadera	24	PEN, CIP, SXT, GEN, RIF	Entre 1 y 11. Ver Tabla 36
	HS37	09/06/2016	P3	Rodilla	24	PEN, ERY, CLI,	
	HS36	09/10/2015	P3	Rodilla	24	CIP, SXT, GEN,	
	HS09	14/12/2015	P3	Rodilla	24	RIF	
IV	HS42	06/07/2016	P11	Cadera	27	PEN, ERY, CLI, OXA, CIP, SXT, GEN	11
	HS40	26/05/2016	P9	Cadera	27	PEN, IMI, ERY, CLI, OXA, CIP, SXT, GEN	
V	HS49	22/11/17	P12	Cadera	43	ERY, CIP, FOS	9
	HS47	13/9/17	P12	Cadera	2	PEN, ERY, CLI, CIP	
VII	HS16	26/2/14	P4	Cadera	28	PEN, ERY, CLI,	3
	HS15	5/2/14	P4	Cadera	28	OXA, CIP, FUS, SXT, GEN, RIF	

En color: coincidencias entre diferentes pacientes.

**Tabla 36.** Diferencia de SNPs entre las cepas del *cluster* I.

	HS09	HS36	HS37	HS38
HS09	0	11	11	9
HS36	11	0	4	4
HS37	11	4	0	1
HS38	9	4	1	0

### 5.7.2. Comparación entre PFGE y WGS

Con el objetivo de comparar los patrones generados mediante PFGE y la agrupación de *clusters* mediante SNPs, en la Tabla 34, se muestran los *clusters* generados a diferentes umbrales de SNPs, y se indican los patrones de PFGE en los que se clasificaron las cepas: a 100 SNPs, coinciden 2/7 (29%), a 50 SNPs 3/7 (43%), a 25 y 20 SNPs 3/6 (50%), a 17 SNPs 3/5 (60%), a 15 y 12 SNPs 3/4 (75%), a 10 SNPs 2/3 (67%) y a 5 SNPs 2/2 (100%).

Se puede apreciar que a medida que el umbral de SNPs es más bajo, los resultados de WGS coinciden más con los de PFGE. La coincidencia total de ambas técnicas se observa aplicando un 84% de similitud en PFGE y un umbral de  $\leq 5$  SNPs. Seguidamente, en el umbral de  $\leq 15$  SNPs, la coincidencia con el PFGE es de un 75% ya que solo difiere en un *cluster* (V), el cual se agrupa en diferentes patrones de PFGE. Mediante PFGE se encontraron más agrupaciones de cepas que por WGS no se han encontrado.

### 5.7.3. Estudio de asociación del genoma completo (GWAS)

El estudio de asociación del genoma completo, en inglés *Genome-Wide Association Study* (GWAS), se llevó a cabo mediante los

softwares Scoary y pyseer en 262 cepas de *S. epidermidis*: 22 cepas ST2 del presente estudio y 240 cepas del estudio de Méric *et al.* <sup>113</sup>.

Los resultados de Scoary mostraron una lista de genes, indicando su presencia y ausencia en las cepas ST2 y en las cepas con otros STs de *S. epidermidis*. Se detectaron genes que estuvieron presentes en la mayoría de cepas ST2, pero también en un gran número de cepas con otros STs (Anexo VII). Por lo tanto, como no se encontraron genes que solamente estuviesen presentes en cepas ST2 o en un bajo porcentaje en los otros STs, no se pudo asociar la presencia de genes al ST2 mediante este análisis.

El análisis realizado mediante pyseer dió como resultado *k*-mers significativos (valor  $p < 2,45 \times 10^{-8}$ ) representados en un gráfico de Manhattan, visualizado en el software interactivo Phandango (Figura 43). Los *k*-mers fueron anotados con los genes que se encontraron alrededor, teniendo en cuenta la secuencia de referencia *S. epidermidis* BPH0662. En la Figura 44 se muestra un ejemplo de una acumulación de *k*-mers en una región intergénica entre la secuencia de inserción *IS110* y la *IS1182*.



**Figura 43.** *k*-mers significativos representados en un gráfico de Manhattan visualizado en Phandango. En la parte superior se muestra la secuencia de referencia (*S. epidermidis* BPH0662) y la posición de los genes anotados. Cada *k*-mer está representado como un punto gris. La acumulación de *k*-mers se correlaciona con el valor de significancia (a mayor acumulación de *k*-mers, mayor significancia). En el eje de las Y se indica el log negativo del *p* valor (valores entre 7 y 25).



**Figura 44.** Ampliación de la región intergénica entre *IS110* y *IS1182*, donde se acumulan *k*-mers significativos. Los recuadros azules seleccionados corresponden a los genes indicados (*IS110* y *IS1182*) en la secuencia de referencia (*S. epidermidis* BPH0662).

El análisis de GWAS mediante pyseer determinó un número mayor de *k*-mers significativos en los siguientes genes: *IS110*, *IS1182*, DNA primasa, *duf1672* y *sprt*.

Para conocer la función de estos genes y saber si eran exclusivos en estafilococos, se realizó una búsqueda en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org>) (Tabla 37). Se encontró la función de todos los genes, excepto de *duf1672*, que es desconocida hasta la fecha. Además, este gen fue el más exclusivo en estafilococos que el



resto, que han sido identificados en una amplia variedad de especies.

- El gen *sprt* y la ADN primasa están involucrados en proceso de replicación del ADN.
- Las secuencias de inserción *IS1182* y *IS110* pertenecen a la familia de transposasas. No se han asociado con genes de resistencia hasta la fecha.

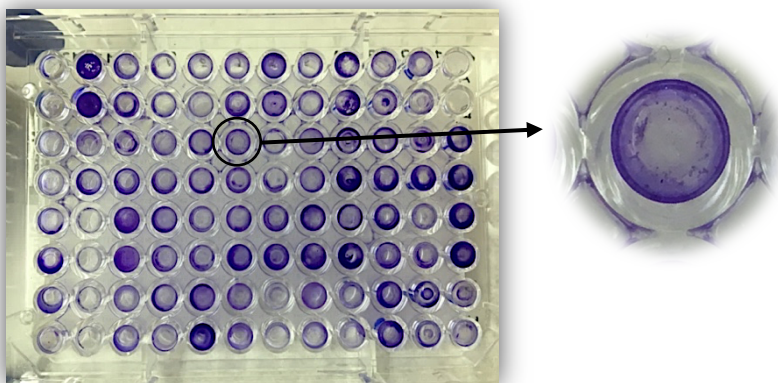
**Tabla 37.** Genes con *k*-mers significativos en las cepas ST2. Información obtenida de <https://www.uniprot.org>.

Gen	Nombre	Función	Especies
<b><i>sprt</i></b>	<i>SprT-like domain-containing protein Spartan</i>	Regulador de la respuesta al daño del ADN inducido por rayos UV. Protección de la estabilidad del genoma durante la replicación del ADN	Gran variedad de especies
<b><i>duf1672</i></b>	<i>DUF1672 domain-containing protein</i>	Desconocida	Staphylococcus y Bacillus
<b>DNA primasa</b>	<i>DNA primase</i>	ARN polimerasa que sintetiza pequeños cebadores de ARN utilizados por la ADN polimerasa en la replicación del ADN	Gran variedad de especies
<b><i>IS1182</i></b>	<i>IS1182 family transposase</i>	Involucrada en la transposición de la secuencia de inserción IS5 (misma familia)	Gran variedad de especies
<b><i>IS110</i></b>	<i>IS110 family transposase</i>	Unión al ADN, actividad transposasa	Gran variedad de especies

Continuando con el análisis de todas las cepas del estudio (IPA, PS y CQ), en el siguiente apartado se muestran los resultados de los análisis relacionados con la formación de *biofilm* como mecanismo de patogenicidad relevante en *S. epidermidis* y los genes asociados.

## 5.8. Formación fenotípica del biofilm

El método de detección fenotípica de *biofilm* mediante la tinción con cristal violeta, permitió cuantificar el *biofilm* producido por cada cepa de *S. epidermidis*. En la Figura 45 puede apreciarse la adhesión de la bacteria al poliestireno y la formación del *biofilm* teñido con cristal violeta. Mediante la medida de absorbancia a una densidad óptica  $DO_{340nm}$ , se clasificaron las cepas como formadoras fuertes de *biofilm* ( $DO_{340nm} > 2$ ), formadoras moderadas ( $DO_{340nm} = 1-2$ ), formadoras débiles ( $DO_{340nm} = 0,4-1$ ) y no formadoras ( $DO_{340nm} < 0,4$ ). En el presente estudio, todas las cepas fueron productoras de *biofilm*, es decir, ninguna cepa produjo una cantidad igual o menor de *biofilm* que el pocillo de control o blanco.



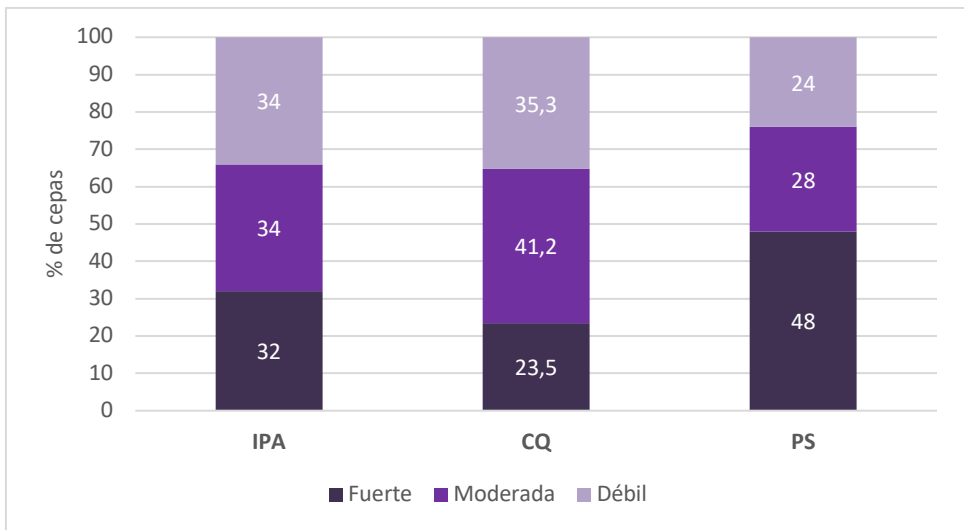
**Figura 45.** Formación de *biofilm* mediante la tinción con cristal violeta.

Como podemos observar en la Tabla 38 y en la Figura 46, los niveles de formación de *biofilm* estuvieron distribuidos de forma similar en las tres poblaciones de cepas, sobre todo entre las cepas IPA (fuerte: 32%; moderada: 34%; y débil: 34%) y en menor medida entre las cepas CQ (fuerte: 23,5%; moderada: 41,2%; y débil: 35,3%). En cambio, en las cepas PS predominó la formación fuerte de *biofilm* (48%) en comparación con la formación moderada (28%) y débil (24%). No se detectaron diferencias significativas entre la producción de *biofilm* y las poblaciones de cepas.

**Tabla 38.** Prevalencia de la formación de *biofilm* en cepas de *S. epidermidis*.

Grado de formación de <i>biofilm</i>	IPA (n=50) n (%)	CQ (n=17) n (%)	PS (n=50) n (%)	Valor <i>p</i>
<b>Fuerte</b>	16 (32)	4 (23,5)	24 (48)	NS
<b>Moderada</b>	17 (34)	7 (41,2)	14 (28)	NS
<b>Débil</b>	17 (34)	6 (35,3)	12 (24)	NS

NS: no estadísticamente significativo, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas. Valor  $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas comparando las tres poblaciones de cepas.



**Figura 46.** Porcentaje de formación de *biofilm* en cepas de *S. epidermidis*. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas.

## 5.9. Detección de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles

### 5.9.1. Por PCR

Se detectaron diferentes determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles mediante PCR. El contenido de genes relacionados con la formación de *biofilm* y su regulación, mostró variabilidad entre las diferentes poblaciones de cepas (Tabla 39 y Figura 47).

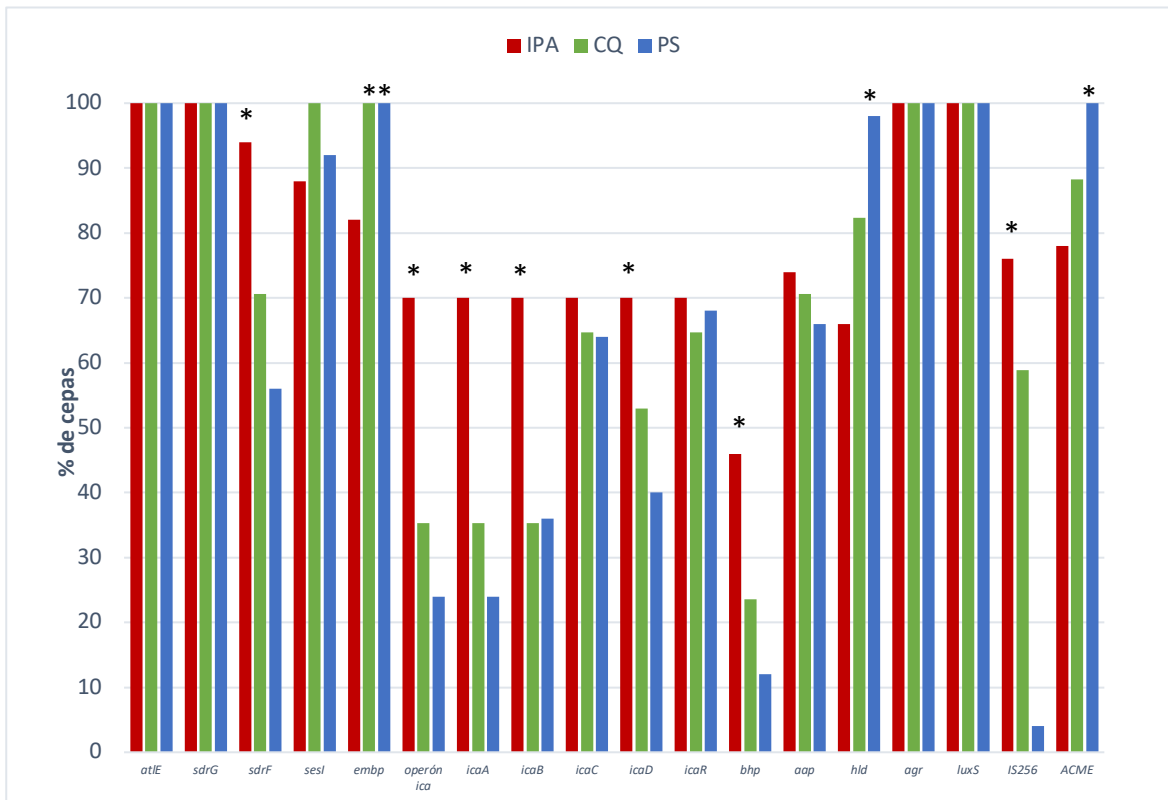
- En las cepas **IPA** predominaron significativamente ( $p < 0,05$ ) los genes *sdrF* (94%), *bhp* (46%), el operón *ica* completo (70%), *icaA* (70%), *icaB* (70%), *icaD* (70%) (involucrados en la fase de adhesión y acumulación) y la secuencia de inserción *IS256* (76%), en comparación con cepas PS y CQ.
- En las cepas **CQ** solamente fue significativa ( $p < 0,05$ ) la presencia del gen *embp* (100%) (involucrado en la fase de adhesión).
- En las cepas **PS** estuvieron presentes de manera significativa ( $p < 0,05$ ) los genes *embp* (100%) y *hld* (98%) (involucrados en la fase de adhesión y maduración y desprendimiento, respectivamente) y el elemento móvil ACME (100%) en comparación con las cepas IPA y CQ.

Los sistemas de regulación *quorum sensing agr* y *luxS* estuvieron presentes en todas las cepas. En la Figura 47, podemos observar como los genes implicados en la fase de adhesión (*atIE*, *sdrG*, *sdrF*, *sesI*, *embp*) han tenido más prevalencia en las cepas que los genes incluidos en la fase de acumulación (operón *ica*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *bhp*, *aap*). Cabe destacar que siempre que estuvo presente el operón *ica* en las cepas IPA, era completo (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*). En cambio, en las cepas PS y CQ podría encontrarse incompleto, con solo la presencia de alguno/s de los genes que lo componen.

**Tabla 39.** Prevalencia de los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles en cepas de *S. epidermidis*.

Determinantes relacionados con la formación de <i>biofilm</i>	Gen	IPA (n=50)	CQ (n=17)	PS (n=50)	P valor
<b>Fase de Adhesión</b>	<i>atIE</i>	50 (100)	17 (100)	50 (100)	NS
	<i>sdrG</i>	50 (100)	17 (100)	50 (100)	NS
	<i>sdrF</i>	47 (94)	12 (70,6)	28 (56)	<0,001
	<i>sesI</i>	44 (88)	17 (100)	46 (92)	NS
	<i>embp</i>	41 (82)	17 (100)	50 (100)	<0,001
<b>Fase de Acumulación</b>	<i>ica</i> operón completo	35 (70)	6 (35,3)	12 (24)	<0,001
	<i>icaA</i>	35 (70)	6 (35,3)	12 (24)	<0,001
	<i>icaB</i>	35 (70)	6 (35,3)	18 (36)	0,001
	<i>icaC</i>	35 (70)	11 (64,7)	32 (64)	NS
	<i>icaD</i>	35 (70)	9 (52,9)	20 (40)	0,01
	<i>icaR</i>	35 (70)	11 (64,7)	34 (68)	NS
	<i>bhp</i>	23 (46)	4 (23,5)	6 (12)	0,001
<i>aap</i>	37 (74)	12 (70,6)	33 (66)	NS	
<b>Fase de Maduración y desprendimiento</b>	<i>hld</i>	33 (66)	14 (82,4)	49 (98)	<0,001
<b>Regulación: Sistema quorum sensing</b>	<i>luxS</i>	50 (100)	17 (100)	50 (100)	NS
	<i>agr</i>	50 (100)	17 (100)	50 (100)	NS
<b>Clasificación de agr (tipos)</b>	<i>agr-I</i>	34 (68)	10 (58,8)	25 (50)	0,001
	<i>agr-II</i>	9 (18)	6 (35,3)	14 (28)	
	<i>agr-III</i>	1 (2)	1 (5,9)	11 (22)	
	<i>agr-IV</i>	6 (12)	0	0	
<b>Elementos móviles</b>	<i>IS256</i>	38 (76)	10 (58,8)	2 (4)	<0,001
	ACME	39 (78)	15 (88,2)	50 (100)	<0,001
<b>Clasificación de ACME (tipos)</b>	ACME-I	1 (2)	1 (5,9)	0	<0,001
	ACME-II	8 (16)	5 (29,4)	0	
	ACME-III	0	0	0	
	ACME-IV	15 (30)	9 (52,9)	38 (76)	
	ACME-V	6 (12)	0	12 (24)	
	ACME-VI	9 (18)	0	0	

NS: no estadísticamente significativo, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas. Valor  $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas comparando las tres poblaciones de cepas.

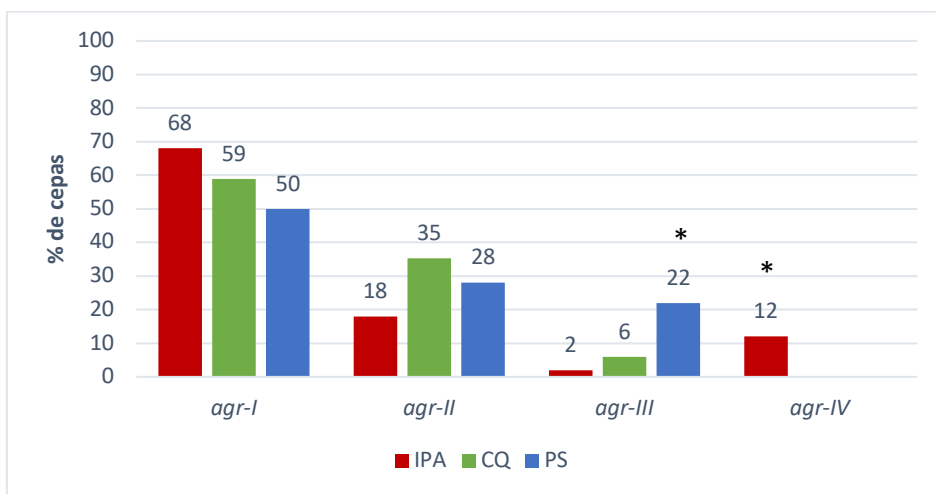


**Figura 47.** Frecuencia de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles en cepas de *S. epidermidis*. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas. \*Valor  $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas comparando las tres poblaciones de cepas.

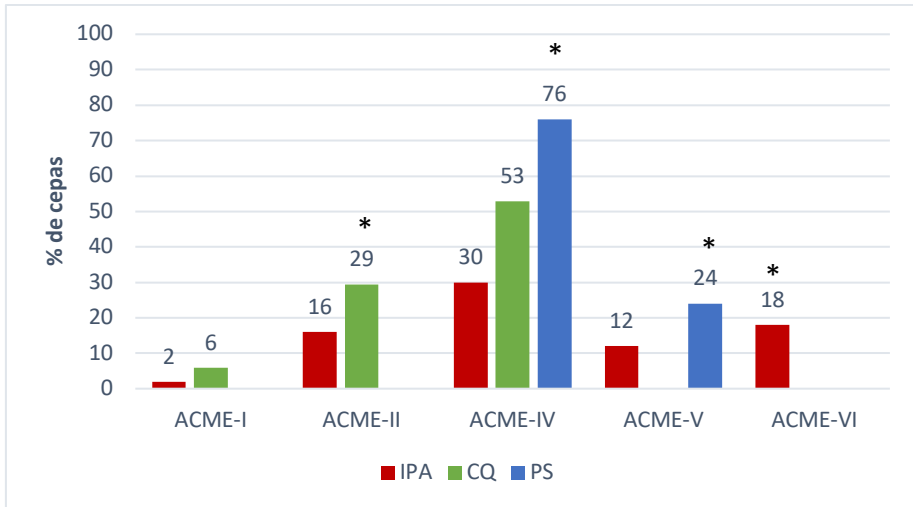
En cuanto a la tipificación del gen *agr* (relacionado con la regulación de la expresión de algunos genes relacionados con la formación de *biofilm*) y del elemento móvil ACME, se encontraron diferencias significativas entre la presencia de los tipos y las tres poblaciones de



cepas de *S. epidermidis* (Figura 48 y Figura 49). Los tipos *agr*-IV y ACME-VI solamente estuvieron presente en las cepas IPA. Por otro lado, en las cepas PS fueron estadísticamente más altos los tipos *agr*-III, ACME-IV y ACME-V, y en las cepas CQ fue significativo el tipo ACME-II.



**Figura 48.** Tipos de *agr* en cepas de *S. epidermidis*. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas. \*Valor  $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas entre las tres poblaciones de cepas.



**Figura 49.** Tipos del elemento móvil ACME (*arginine catabolic mobile element*) en cepas de *S. epidermidis*. IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas. \*Valor  $p < 0,05$ : diferencias estadísticamente significativas entre las tres poblaciones de cepas. El ACME-III no fue detectado en nuestro estudio.

### 5.9.2. Por WGS

La detección de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles también se llevó a cabo por WGS. En este apartado se detallan los resultados comparativos de ambas técnicas (PCR y WGS) (Tabla 40). Aclarar que, sólo se incluyen los

resultados comparativos de las cepas secuenciadas de *S. epidermidis* ST2.

El software VirulenceFinder solo detectó el elemento móvil ACME, así que se complementó con la PCR *in silico* para la detección de todos los genes. En cuanto a la comparativa de PCR y WGS, hubo una gran concordancia entre los dos métodos, sólo se detectaron pequeñas discordancias entre las dos técnicas (Tabla 40):

- En tres cepas: el gen *embp* (cepa HS54) y la *IS256* (cepas HS31 y HS32), fueron detectados por PCR y no por WGS.
- En siete cepas: el gen *sesI* fue detectado por PCR y no por WGS.
- El gen *bhp* no fue posible de detectar por WGS.

**Tabla 40.** Detección de genes relacionados con la formación de *biofilm* por PCR y WGS.

Cepas	atIE WGS	atIE PCR	sdrG WGS	sdrG PCR	sdrF WGS	sdrF PCR	embp WGS	embp PCR	operón ica WGS	operón ica PCR	aap WGS	aap PCR	hld WGS	hld PCR	agr WGS	agr PCR	IS256 WGS	IS256 PCR	luxS WGS	luxS PCR	sesI WGS	sesI PCR
HS04	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS07	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS09	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS15	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS16	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS18	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS27	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS28	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS31	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS32	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS36	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS37	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS38	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS40	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS41	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS42	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS47	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS49	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS51	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White
HS54	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	White	White	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS56	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
HS57	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow

En color: presencia, en blanco: ausencia, en verde: WGS, en amarillo: PCR, \*: discordancia entre PCR y WGS.

## 5.10. Relación de secuenciotipos (STs) y determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles

En este estudio observamos una clara relación entre los STs y el contenido de genes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles de las cepas de *S. epidermidis* (Figura 51). Según el ST con el que se clasificaron las cepas de *S. epidermidis*, se observaron perfiles de contenido genético similares en estas cepas, es decir, las cepas que pertenecían a un mismo ST contenían el mismo patrón de genes con alguna variación de algunos genes. Por ejemplo: las cepas pertenecientes al ST2 (n=22) pertenecieron al grupo de infección (IPA) y todas contenían los genes *sesI*, *sdrF*, *ica*, *aap*, *hld* y *IS256* y el tipo *agr-I*, con variaciones en los genes *embp*, *bhp* y ACME (Figura 51). Las variaciones observadas fueron que 14/22 cepas, 3/22 cepas y 18/22 cepas de este grupo contenían *embp*, *bhp* y ACME, respectivamente. A pesar de estas variaciones, son 7 genes los que se han mantenido estables en todas las cepas de este ST.

De igual manera, los secuenciotipos ST5, ST640, ST32, ST35, ST89 y ST657 presentaron un patrón de genes específico, aunque el número de cepas incluido en estos STs fue más bajo (8, 6, 5, 5, 5, 3, respectivamente) (Tabla 41). Aún y así, se destaca que el ST35,

presente en las tres poblaciones de cepas, incluye cinco cepas que contienen los genes *embp*, *sesl*, *ica*, *aap*, *hld*, ACME y el tipo *agr*-I. La única variación que presenta es el tipo de ACME, que estuvo presente tanto el ACME-I como el ACME-IV.

**Tabla 41.** Relación entre los secuenciotipos y los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles.

ST	Poblaciones	n	<i>embp</i>	<i>sesl</i>	<i>sdrF</i>	<i>ica</i>	<i>bhp</i>	<i>aap</i>	<i>hld</i>	<i>IS256</i>	ACME	<i>agr</i> tipo	ACME tipo
ST2	IPA	22	14				3				18	I	II,IV,V,VI
ST5	IPA y PS	8				2			3	6		I, II, III	IV,V
ST640	IPA	6		1		1					4	IV	II,IV,VI
ST32	PS y CQ	5				1		1		1		II	IV,V
ST35	IPA, PS y CQ	5										I	I,IV
ST89	PS y CQ	5				1				1		I	IV
ST657	IPA, PS y CQ	3				1			2		2	I	IV

Negro: el gen estuvo presente en todas las cepas del ST; blanco: el gen estuvo ausente en todas las cepas del ST; gris: variable (presente o ausente); el número indicado dentro de la casilla indica el número de cepas que contienen el gen. En la fase de adhesión: *embp*, *sesl*, *sdrF*; en la fase de acumulación: operón *ica*, *bhp*, *aap*; en la fase de maduración y desprendimiento: *hld*; elementos móviles: *IS256*, ACME. ST: secuenciotipo, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas.

### 5.11. Relación entre los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y la formación fenotípica de *biofilm*

La comparación entre los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y la formación fenotípica de *biofilm* (fuerte, moderada o débil), mostró la existencia de una relación de los genes *sdrF* (34/44; 77,3%), *sesI* y *embp* (43/44; 97,7%, ambos), *aap* (35/44; 79,5%), *hld* (37/44; 84,1%) y ACME (40/44; 90,9%), y el grado de formación de *biofilm* fuerte ( $p < 0,05$ ); concretamente en las cepas comensales, que es la población donde predominó más la formación de *biofilm* fuerte. En contraste, las cepas *icaA* positivas no estuvieron (como se pudiese esperar) asociadas con la formación fuerte de *biofilm*, ya que de 44 cepas productoras de *biofilm* fuerte, sólo 18 contenían el gen *icaA* (Tabla 42).

**Tabla 42.** Presencia de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* en la formación de *biofilm* fuerte.

Determinantes relacionados con la formación de <i>biofilm</i>	Formación de <i>biofilm</i> fuerte (n=44) n (%)
<i>embp</i>	43 (97,7)*
<i>sesI</i>	43 (97,7)*
<i>sdrF</i>	34 (77,3)*
<i>icaA</i>	18 (40,9)
<i>icaB</i>	22 (50)
<i>icaC</i>	28 (63,6)
<i>icaD</i>	23 (52,3)
<i>icaR</i>	27 (61,4)
<i>bhp</i>	7 (15,9)
<i>aap</i>	35 (79,5)*
<i>hld</i>	37 (84,1)*
<i>IS256</i>	12 (27,3)
<b>ACME</b>	40 (90,9)*

\*Valor  $p < 0,05$  significativo. Los genes *sdrG*, *atIE*, *agr* y *luxS* se detectaron en todas las cepas.



## 5.12. Relación de los determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y la sensibilidad a antibióticos

Se ha descrito ampliamente en la literatura <sup>24,52</sup>, una relación entre la resistencia a los aminoglucósidos, particularmente la gentamicina y la presencia de la secuencia de inserción *IS256*. En nuestro estudio, el 85,7% de las cepas resistentes a gentamicina (36/42), fueron positivas para *IS256* ( $p < 0,05$ ), a diferencia de las cepas sensibles a gentamicina (14/75), que solo un 18,7% fueron *IS256* positivas (Tabla 43).

Como resultado de interés, se destaca que la *IS256* también mostró una asociación significativa ( $p < 0,05$ ) con la existencia de resistencia a penicilina, eritromicina, clindamicina, oxacilina, ciprofloxacino, cotrimoxazol y rifampicina, es decir, con el fenotipo de multirresistencia (Tabla 43).

Por otro lado, se observó que el gen *icaA* estuvo más presente significativamente ( $p < 0,05$ ), en cepas resistentes a penicilina, oxacilina, ciprofloxacino, clindamicina, cotrimoxazol, gentamicina y rifampicina (Tabla 43).

**Tabla 43.** Resistencia antibiótica según la presencia de la secuencia de inserción *IS256* y el gen *icaA*.

Antibiótico	R/S	<i>IS256</i> +	Valor <i>p</i>	<i>icaA</i> +	Valor <i>p</i>
Penicilina	R	43/86 (50%)	0,011	45/86 (52,3%)	0,012
	S	7/31 (22,6%)		8/31 (25,8%)	
Eritromicina	R	41/81 (50,6%)	0,015	41/81 (50,6%)	NS
	S	9/36 (25%)		12/36 (33,3%)	
Clindamicina	R	34/49 (69,4%)	<0,001	29/49 (59,2%)	0,014
	S	16/68 (23,5%)		24/68 (35,3%)	
Oxacilina	R	32/55 (58,2%)	0,003	33/55 (60%)	0,003
	S	18/62 (29%)		20/62 (32,3%)	
Ciprofloxacino	R	34/41 (82,9%)	<0,001	32/41 (78%)	<0,001
	S	16/76 (21,1%)		21/76 (27,6%)	
Cotrimoxazol	R	30/41 (73,2%)	0,013	21/41 (51,2%)	<0,001
	S	20/76 (26,3%)		24/76 (31,6%)	
Rifampicina	R	14/18 (77,8%)	0,002	16/18 (88,9%)	<0,001
	S	36/99 (36,4%)		37/99 (37,4%)	
Gentamicina	R	36/42 (85,7%)	<0,001	33/42 (78,6%)	<0,001
	S	14/75 (18,7%)		20/75 (26,7%)	

R: cepas resistentes, S: cepas sensibles. Valor  $p < 0,05$ : estadísticamente significativo.

### 5.13. Relación de secuenciotipos (STs) y la sensibilidad a antibióticos

En cuanto a la asociación entre STs y la sensibilidad a los antibióticos evaluados, no fue posible extraer relaciones con todos los STs, ya que la mayoría incluye un bajo número de cepas. El ST2 (n=22), seguido del ST5 (n=8) y el ST640 (n=6), incluyeron un mayor número de cepas, los otros STs incluyeron un número de cepas menor a 6; de esta manera solo se analizaron estos 3 STs (Tabla 44).

- **ST2**: todas las cepas pertenecientes a este ST fueron resistentes a cotrimoxazol; el 95,5% (21/22) a penicilina, ciprofloxacino y gentamicina; el 81,8% (18/22) a eritromicina y clindamicina; y el 77,3% a oxacilina (17/22). Es decir, todas las cepas ST2 fueron multirresistentes.

- **ST5**: el 87,5% (7/8) fueron resistentes a penicilina y oxacilina y el 75% (6/8) a ciprofloxacino y gentamicina. El 75% de cepas fueron multirresistentes.

- **ST640**: todas las cepas fueron resistentes a oxacilina, seguido de un 50% (3/6) de resistencia a penicilina y eritromicina. El 50% de cepas fueron multirresistentes.

**Tabla 44.** Resistencia antibiótica según el secuenciotipo.

ST	Poblaciones	n	PEN	ERY	CLI	OXA	CIP	COT	RIF	GEN	FUS	FOS	TET	MD
ST2	IPA	22	21	18	18	17	21	22	11	21	6	6	0	22
ST5	IPA y PS	8	7	5	3	7	6	0	0	6	3	4	2	6
ST640	IPA	6	3	3	1	6	1	2	1	1	2	2	1	3

ST: secuenciotipo, IPA: infección de prótesis articular, CQ: campo quirúrgico, PS: personas sanas, PEN: penicilina, ERY: eritromicina, CLI: clindamicina, OXA: oxacilina, CIP: ciprofloxacino, COT: cotrimoxazol, RIF: rifampicina, GEN: gentamicina, FUS: ácido fusídico, FOS: fosfomicina, TET: tetraciclina, MD: multirresistencia.

## 5.14. Publicación

Los resultados derivados del estudio de sensibilidad antibiótica, epidemiología molecular, detección de genes de virulencia y resistencia, y formación de *biofilm* fueron publicados en el *Journal of Hospital Infection* (Journal con clasificación según JRC año 2018 en Q1) (Figura 50) (<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.04.026>).



## Pathogenesis of *Staphylococcus epidermidis* in prosthetic joint infections: can identification of virulence genes differentiate between infecting and commensal strains?☆

A. Sánchez<sup>a,b</sup>, N. Benito<sup>c,d</sup>, A. Rivera<sup>a</sup>, L. García<sup>a</sup>, E. Miró<sup>a</sup>, I. Mur<sup>c</sup>,  
Y. González<sup>a</sup>, C. Gutiérrez<sup>a</sup>, J.P. Horcajada<sup>e</sup>, P. Espinal<sup>a,1,2</sup>, F. Navarro<sup>a,b,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Infectious Diseases Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 February 2020

Accepted 17 April 2020

Available online 24 April 2020

#### Keywords:

Coagulase-negative

staphylococci

Biofilm

Virulence

Prosthetic joint infections

Commensal



### SUMMARY

**Background:** *Staphylococcus epidermidis* is a commensal of human skin flora and a frequent causative micro-organism in prosthetic joint infections (PJIs). To date, no single marker has been identified to distinguish infecting strains from commensal *S. epidermidis* populations.

**Aim:** To find possible genetic markers to distinguish between the two populations.

**Methods:** Fifty *S. epidermidis* strains from patients with PJIs were analysed, 50 from the skin of healthy individuals (commensal strains) and 17 from the surgical field of patients undergoing primary arthroplasty. In these three groups the antimicrobial susceptibility profile, sequence type, biofilm formation, and virulence factors were studied. Strains from the surgical field have not been compared previously with strains from the other two groups.

**Findings:** *S. epidermidis* strains from PJI patients were significantly more antibiotic resistant than commensal strains and surgical field strains. A wide variety of sequence types was found in commensal and surgical field strains. The predominant sequence type was ST2 and it was only present in PJI strains (44%). Differences in biofilm production did not differ between populations. Virulence genes *sdrF* and *bhp*, the complete *ica* operon, and the insertion sequence *IS256* were significantly predominant in PJI strains. By contrast, *embp* and *hid* genes and the arginine catabolic mobile element (ACNE) were more

Figura 50. Publicación derivada del presente trabajo.



# 6. Discusión







*Staphylococcus epidermidis* es un microorganismo predominante en la microbiota de la piel humana, que ha resultado ser el objetivo de muchos estudios enfocados en la búsqueda de marcadores genéticos, que puedan diferenciar las cepas de *S. epidermidis* comensales de las cepas causantes de infección de prótesis articular<sup>50,72,113</sup>. La detección de marcadores discriminatorios entre estas dos poblaciones de cepas, podría contribuir a tener un mejor pronóstico de la infección y un enfoque del tratamiento más apropiado, además de poder mejorar el estado del paciente.

En el presente estudio se analizaron tres poblaciones de cepas de *S. epidermidis*: cepas de pacientes con IPA, cepas de individuos sanos y cepas del campo quirúrgico de pacientes que se sometieron a una artroplastia primaria. Nuestros hallazgos sugieren que el último grupo de cepas puede usarse como un grupo control válido, teniendo en cuenta que además de ser cepas comensales que no han causado una infección, están presentes en una posible ruta de entrada para las cepas causantes de infección. Como se ha descrito, una de las posibles causas de infección de prótesis puede deberse a microorganismos presentes en el campo quirúrgico, de la flora endógena de la piel del paciente y del personal médico<sup>4</sup>. En este estudio, las cepas de *S. epidermidis* encontradas en el campo quirúrgico no han producido IPA, hasta la fecha.

## Resistencia antimicrobiana

La resistencia antibiótica está considerada una amenaza para la salud mundial. Los *S. epidermidis* resistentes a antibióticos se han encontrado en varias fuentes, como en superficies ambientales, ropa personal, dispositivos médicos, y la piel de los trabajadores sanitarios y de los pacientes <sup>34</sup>. Los ensayos de sensibilidad antibiótica del estudio mostraron claramente que las cepas de infección (IPA) fueron significativamente más resistentes a antibióticos que las cepas comensales (PS) y de campo quirúrgico (CQ), especialmente a la penicilina (86%), oxacilina (74%), ciprofloxacino (76%), clindamicina (66%), cotrimoxazol (64%), gentamicina (80%) y rifampicina (34%) (Tabla 26). Nuestros resultados son congruentes con otros autores que han encontrado las cepas de infección protésica, más resistentes que las cepas comensales en otros estudios y diferentes regiones geográficas <sup>72,73,125</sup>. Por ejemplo, en México, el estudio de Ortega-Peña y cols., mostró resultados de resistencia antimicrobiana similares a los nuestros (IPA vs PS): 78% vs 25% a oxacilina, 60% vs 13% a ciprofloxacino, 41% vs 25% a cotrimoxazol, 35% vs 13% a gentamicina, y 10% vs 0% a rifampicina, aunque también se encontraron resultados contrarios para penicilina (82% vs 96%) y clindamicina (27% vs 33%). Las cepas comensales son más sensibles a los antibióticos, posiblemente porque no han sufrido ninguna presión selectiva. Los participantes del grupo PS incluidos en este

estudio, no habían recibido tratamiento con antibióticos, ni habían estado en contacto con el ambiente nosocomial en los últimos tres meses desde la recogida de la muestra. En contraste, los pacientes de los grupos de cepas IPA y CQ, sí que recibieron una profilaxis antibiótica y habían estado en contacto con el ambiente hospitalario, lo que se ha reflejado en unas tasas más altas de resistencia antimicrobiana. Entre estos dos grupos, las cepas IPA fueron más resistentes que las cepas CQ. Lo anterior nos permite sugerir que, como las cepas CQ fueron recolectadas durante la cirugía, podrían haber tenido un menor tiempo de contacto con el antibiótico profiláctico que las cepas IPA. En cambio, las cepas IPA permanecen en la prótesis, lo que aumenta el tiempo de exposición al antibiótico. Así, solo, pueden llegar a superar la barrera antibiótica y causar infección si son resistentes a los antibióticos profilácticos. Por lo tanto, es posible que la presión selectiva ejercida sobre las cepas de IPA fuese mayor que la ejercida en las cepas de CQ.

En nuestro estudio, todas las cepas permanecieron sensibles a la teicoplanina, vancomicina, daptomicina y tigeciclina. De ahí, que la vancomicina y la daptomicina se pueden considerar buenas opciones terapéuticas para el tratamiento empírico de IPA <sup>95</sup>. Especialmente, la vancomicina, que es el antibiótico más recomendado como tratamiento dirigido de IPA causada por MRSA/MRSE, seguido de daptomicina <sup>13</sup>. Varios estudios sugieren como tratamiento dirigido de IPA causada por MSSA/MSSE, la

cefazolina, y causada por MRSA/MRSE, la vancomicina; como tratamiento alternativo (pacientes alérgicos a betalactámicos) a MSSA/MSSE, la vancomicina, daptomicina y linezolid, y a MRSA/MRSE, la daptomicina y linezolid; y como terapia en combinación, la rifampicina <sup>13,16,94</sup>. En España, Ariza *et al.* sugieren otra terapia antimicrobiana para MSSA/MSSE con cloxacilina o cefazolina y daptomicina, para MRSA/MRSE con vancomicina o daptomicina combinada con cloxacilina o fosfomicina, y como tratamiento alternativo con daptomicina en combinación con fosfomicina para ambos casos de sensibilidad a meticilina <sup>126</sup>. Para IPAs causadas por MRSA/MRSE, además de cefazolina y cloxacilina, es recomendado el uso de otros betalactámicos, como nafcilina y ceftriaxona <sup>13,16</sup>.

En cuanto a la rifampicina y ciprofloxacino, en nuestro estudio se han encontrado tasas de resistencia del 34% en rifampicina y 76% en ciprofloxacino, en cepas de IPA. Aunque estos antibióticos también son recomendados en el tratamiento de IPA <sup>13,15,31,96</sup>, vemos que hay porcentajes de resistencia elevados.

Una de las resistencias antibióticas más conocidas en los estafilococos, es la resistencia a meticilina. En nuestro estudio, se encontró un 47% de *S. epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE), representando cerca de la mitad de la colección de cepas. La frecuencia de MRSE en hospitales puede alcanzar valores tan altos como el 60-80% e incluso superar la incidencia de *Staphylococcus*

*aureus* resistentes a meticilina (MRSA) <sup>34,127</sup>. Por esta razón, la mayoría de  $\beta$ -lactámicos, incluidos la penicilina o cefalosporinas, son ineficaces en el tratamiento de una infección por MRSE <sup>128</sup>. Hay datos mínimos disponibles acerca de la efectividad en IPA de los nuevos betalactámicos (ceftarolina y ceftobiprole) activos frente a estafilococos resistentes a meticilina, pero sugieren un papel potencial de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones ortopédicas <sup>129</sup>. Los resultados de varios estudios demostraron que tanto la ceftarolina como el ceftobiprol tienen una excelente actividad *in vitro* contra los estafilococos asociados a IPA, incluidos los MRSA/MRSE <sup>130-132</sup>.

Los MRSE fueron significativamente más altos en las cepas IPA (74%) que en las cepas PS (18%) y cepas CQ (53%). Esto sugiere que el fenotipo MRSE es una característica importante para distinguir las cepas causantes de IPA de las cepas comensales <sup>50</sup>. Además, las diferentes tasas de MRSE en IPA y en comensales fueron similares a las reportadas en otros estudios <sup>50,72,73</sup>. Concretamente, la resistencia a oxacilina en las cepas de IPA (74%) fue similar a los últimos reportes de nuestra institución (70-82%) durante 1999-2017 (<http://www.santpau.cat/es/web/public/resums-de-sensibilitat>).

De igual manera que la prevalencia del fenotipo MRSE en las cepas IPA, el gen de resistencia a meticilina (*mecA*) también tuvo diferencias significativas en las cepas IPA, en comparación con las cepas PS y cepas CQ. Estos resultados son concordantes con el estudio de Méric *et al.*, donde consideran el gen *mecA* como el

mejor predictor para considerar si un aislado de *S. epidermidis* proviene de una infección<sup>113</sup>. El gen *mecA* se detectó en 53/55 cepas resistentes, lo que significa que este gen no fue el mecanismo de resistencia a oxacilina en las dos cepas restantes. Existen otros mecanismos que pueden explicar el fenotipo de resistencia a oxacilina en ausencia del gen *mecA*; entre ellos, la sobreproducción de la  $\beta$ -lactamasa, la producción de una nueva meticilinasas o el cambio en las proteínas de unión a la penicilina<sup>133</sup>.

Por otro lado, la tipificación del cassette SCC*mec* por PCR<sup>78</sup>, no proporcionó en nuestro estudio ninguna combinación de los complejos *ccr* y *mec* que coincidiese con las combinaciones descritas. Del mismo modo, otros estudios también tuvieron este problema, aunque a diferencia de nuestro caso, sí que consiguieron tipificar algún aislado por PCR<sup>127,134–136</sup>. Por ejemplo, Faria *et al.* pudieron tipificar la mayoría de aislados de *S. epidermidis*, donde predominó el SCC*mec* tipo IV, excepto en el 27% de los aislados que no fue posible la tipificación por motivos similares a los nuestros: detección de *ccr* pero no de *mec*, y detección de dos genes *ccr* y uno de *mec*<sup>134</sup>. En el caso de Svensson *et al.*, solo pudieron tipificar 3/20 cepas de *S. epidermidis*, y las no tipables fueron: *ccr1*, *ccr2* y *ccr3* positivas; *ccr3*, *ccr4* y *ccr5* positivas; *ccr* negativas; *mec* negativas; *ccr* y *mec* negativas. Esta variación en la estructura del SCC*mec* demuestra que la adquisición y pérdida de elementos genéticos móviles como SCC*mec* y los eventos de recombinación, son muy

frecuentes en *S. epidermidis* <sup>135</sup>. Hanssen *et al.* intentaron encontrar una explicación, sugiriendo que los genes *ccr* pueden ser eliminados después de su inserción o que el gen *mecA* puede insertarse cromosómicamente independiente del gen *ccr* <sup>137</sup>. Svensson *et al.* añadieron que las cepas no tipificables podían contener tipos de *ccr* y *mec* aún no descritos, los cuales no podemos detectar con los cebadores de PCR descritos actualmente <sup>136</sup>. Debido a la gran variabilidad genética que se ha dado en la tipificación de SCC*mec* y a la existencia de un número elevado de elementos no tipificables, nuevos tipos con nuevas combinaciones de los complejos *ccr* y *mec* han de ser definidos en *S. epidermidis*. Cabe destacar que la combinación encontrada con mayor frecuencia en el presente estudio fue *ccr1-ccr2-mecB* (35%), muy similar al estudio de Svensson *et al.* (23%) <sup>136</sup>, así que podríamos estar hablando de un nuevo tipo de SCC*mec* bastante predominante en *S. epidermidis*.

Adicionalmente, se realizó la tipificación del cassette SCC*mec* por análisis mediante secuenciación masiva (WGS) de las 22 cepas de *S. epidermidis* ST2, y se obtuvo el tipo de SCC*mec* en 10 de las 13 cepas que fueron *mecA* positivas: 5 cepas pertenecieron al SCC*mec* tipo III y 5 cepas al SCC*mec* tipo IV, éste último, el más frecuentemente descrito en *S. epidermidis* <sup>24</sup>. En comparación con la PCR, la técnica de WGS permitió tipificar cepas que con la PCR no fue posible, y no se detectaron varios tipos de *ccr* y/o *mec* por WGS, aunque hubo cepas que no se pudieron tipificar por falta de la detección de *ccr*

(3/13). Estos resultados, nos muestran que la herramienta de WGS es más precisa a la hora de tipificar el SCCmec, puesto que se encontraron más tipos de SCCmec que mediante la PCR. Hosseinkhani *et al.* tampoco pudieron tipificar sus cepas mediante la aplicación de la PCR, en cambio la técnica de WGS representó una mejor vista de la estructura de SCCmec. Los investigadores, demostraron que los resultados de la PCR no fueron lo suficientemente precisos para la tipificación de SCCmec, debido a que los genes *ccr* suelen encontrarse dispersos por todo el genoma y pueden dar lugar a una falsa clasificación del SCCmec<sup>138</sup>. Además, la variabilidad de protocolos descritos para la tipificación de SCCmec por PCR<sup>78,139,140</sup>, los cuales incluyen diferentes cebadores, resalta la importancia de un consenso para reducir la variabilidad entre estudios. Desde el uso de WGS, la cantidad de tipos y subtipos de SCCmec en estafilococos ha aumentado exponencialmente, y esto desafía los criterios y metodologías tradicionales basados en PCR<sup>84</sup>. Teniendo en cuenta estos hallazgos, sugerimos que, la tipificación del cassette SCCmec mediante el protocolo de múltiplex-PCR descrito por Kondo *et al.*<sup>78</sup>, debería sustituirse, si es posible, por la técnica de WGS, teniendo en cuenta que su uso se está incrementando y que los costos son cada vez menores. El protocolo de PCR incluye una gran cantidad de cebadores y de PCRs, y sus resultados no parecen ser tan eficientes como los de WGS, la cual reduce la variabilidad de los resultados observados en la PCR y obtiene un número mayor de tipos de SCCmec.



La resistencia a MLS<sub>B</sub> (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B) es conocida también en estafilococos y estuvo asociada mayoritariamente por la presencia de los genes *mphC* (90%), *msrA* (89%) y *ermC* (68%). Los genes *ermA* (11%) y *ermB* (3%) tuvieron poca prevalencia y no se encontró un mecanismo de resistencia específico para la clindamicina, ya que no se detectó el gen *lnu(A/A')*. En las cepas resistentes a eritromicina, los resultados mostraron que el mecanismo de resistencia de modificación de la diana por las metilasas (*erm*), fue menos frecuente que la inactivación enzimática por *mphC* y la bomba de flujo *msrA*, en contraste con otros reportes<sup>85,89,135,141</sup>. En el estudio realizado por McManus *et al.*<sup>142</sup> se encontraron resultados similares a los nuestros: *msrA* fue el más encontrado (46%), seguido de *ermC* (32%), *mphC* (18%) y en menor medida, *ermA* (7%) y *ermB* (0%). Tampoco encontraron el gen *lnu(A/A')* en sus cepas de *S. epidermidis*. Aunque los porcentajes son más bajos en su estudio, se observó que hay predominio de los mismos mecanismos de resistencia que en nuestro estudio. Entre los genes *erm*, el más predominante fue *ermC* (68%), lo cual concuerda con el rango de 47%-97% de otros estudios en diferentes partes del mundo (Túnez y Bélgica)<sup>89,135,141</sup>.

En el análisis de las cepas secuenciadas de *S. epidermidis* ST2, solo se pudo detectar el gen *ermC*, que coincidió totalmente con los resultados de PCR, con excepción de una cepa, en la que fue detectado el gen por PCR y no por WGS. Los genes *ermA*, *ermB*,

*mphC* y *msrA* no fueron detectados mediante la PCR *in silico* (WGS), ni estaban presentes en las bases de datos utilizadas para la detección de genes de resistencia antimicrobiana (ResFinder, CARD y NCBI).

Una posible explicación para la discrepancia de la detección del gen *Inu(A/A')* por WGS y no por PCR, puede atribuirse al fragmento delimitado por los cebadores usados en la PCR, el cual podría ser más pequeño que la secuencia del gen completo detectada por WGS, e insuficiente para poder detectarse por PCR. El error podría estar en los cebadores escogidos con los que se amplificó el gen por PCR, aunque fueron descritos por la literatura <sup>143</sup>.

En el caso de los aminoglucósidos, la resistencia estuvo relacionada con la presencia de los genes *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* (83%) y *ant(4')-IaC* (95%) y la combinación de ambos genes (81%), similar a lo descrito en otros reportes <sup>125,135,141,142,144</sup>. En el estudio de Cherifi *et al.*, la resistencia a aminoglucósidos estuvo mediada principalmente por el gen *ant(4')-IaC* (100%) o en combinación con *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* (59%) <sup>125</sup>; el gen *ant(4')-IaC* fue el mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más predominante, igual que en el presente estudio, y el segundo mecanismo fue la combinación de *ant(4')-IaC* y *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia*, a diferencia de nuestros resultados, que fue el gen *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* solo. En cambio, Deplano *et al.* tuvieron la presencia del gen *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* (82%), el gen *ant(4')-IaC* (55%), y de ambos genes (18%), en las cepas

resistentes a gentamicina, resultados que difieren un poco con los nuestros <sup>141</sup>.

Con los aminoglucósidos, también se compararon los resultados obtenidos mediante PCR y el análisis por WGS de las cepas ST2, y se detectaron discrepancias en los resultados: los genes *aac(6')-Ib\_aph(6)-Ia* y *ant(4')-IaC* se detectaron en algunas cepas por PCR y no por WGS. Descartamos un posible error relacionado con la búsqueda en las bases de datos, ya que ambos genes estaban presentes en las bases de datos consultadas en el análisis por WGS, y en la PCR *in silico* tampoco se encontraron. Así que podría estar relacionado con la técnica de PCR, donde pudieron haber subpoblaciones que contuviesen los genes.

La resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) se asoció con la presencia del gen *dfrS*, ya que se encontró en todas las cepas resistentes a cotrimoxazol (n=41). En Irlanda, McManus et al. también reportaron altos porcentajes del gen *dfrS* (86%) <sup>142</sup>. En contraste, en Túnez, solo un 38% de cepas resistentes a cotrimoxazol fueron positivas para el gen *dfrS* <sup>145</sup>.

Los resultados de detección del gen *dfrS* en las cepas de *S. epidermidis* ST2, secuenciadas por WGS, coincidieron con los obtenidos por PCR.

En nuestro estudio, se encontraron dos cepas de IPA resistentes a linezolid, en las que se detectaron las mutaciones G2603T en el 23S

rRNA (*rpoB*) y Val154Leu en la proteína L3 (*rpIC*) y se descartó el gen *cfr* y mutaciones en las proteínas L4 (*rpID*) y L22 (*rpIV*). Aunque las mutaciones más frecuentes en estafilococos resistentes a linezolid son G2576T y T2500A en el 23S rRNA <sup>146</sup>, la mutación G2603T ha sido también descrita en otros estudios <sup>147,148</sup>. De la misma manera, la mutación Val154Leu en la proteína ribosomal L3 también ha sido descrita en otras cepas de *S. epidermidis* resistentes a linezolid <sup>146,149,150</sup>.

En cuanto a la detección de estas mutaciones en las cepas de *S. epidermidis* ST2 por WGS, los resultados coincidieron con los de PCR, con excepción de la mutación en el 23S rRNA que no fue encontrada por WGS. Puede ser debido a la presencia de subpoblaciones que no contengan la mutación o que las cepas hayan perdido la mutación a medida que se realizan pases, ya que son cepas aisladas en el 2015.

### Clonalidad de las cepas

El estudio de clonalidad en las cepas IPA y CQ mediante PFGE, mostró bastante heterogeneidad en las cepas. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Miragaia *et al.*, donde explican que el PFGE permite detectar cambios en el genoma, como la rápida evolución de los patrones de macrorestricción en cepas aisladas de un mismo paciente durante diferentes episodios de infección. Añaden que la inserción/escisión frecuente de elementos móviles, como la secuencia de inserción *IS256* y el cassette *SCCmec*, pueden

contribuir a la diversidad en el número y localización de secuencias de restricción por *Sma*I en el cromosoma de *S. epidermidis* <sup>103</sup>. En cuanto a los criterios establecidos, Miragaia *et al.* propuso una asignación automatizada de los tipos de PFGE, donde los patrones de bandas que difiriesen en menos del 79% se podían considerar el mismo tipo de PFGE <sup>103</sup>. En nuestro caso, teniendo en cuenta los criterios de Tenover <sup>61</sup>, el cual define que con 2-3 bandas de diferencia se consideran estrechamente relacionados, el punto de corte resultó en un 84% aproximadamente. Si se establecía el punto de corte en 79%, se adicionaba un nuevo patrón de PFGE, con dos cepas de diferentes pacientes, pero con más de 2-3 bandas de diferencia. Estas variaciones pueden atribuirse por diferencias en las ejecuciones de la técnica de PFGE, ya que es una técnica compleja, sujeta a variación entre laboratorios. Aún y así, los valores son similares (84% vs 79%) y los resultados fueron concordantes, excepto para dos cepas.

En el análisis del dendrograma, se encontraron cinco patrones de PFGE que contenían cepas estrechamente relacionadas que podrían tener una relación clonal entre ellas. Para confirmar que se trataba de una transmisión, se revisaron aspectos clínico-epidemiológicos entre las cepas, y no se determinó la existencia de una posible transmisión. Esta búsqueda resulta ser una labor compleja, si tenemos en cuenta que, en una cirugía, además de intervenir los cirujanos principales, también está presente el anestesista, el

personal de enfermería y los auxiliares, además de los posibles residentes o estudiantes en prácticas. Así que, básicamente se pueden estudiar las historias clínicas de los pacientes, la sala de cirugía, la fecha y hora, pero no todo el personal implicado en la operación, ni todo el material utilizado en la misma, sino solo el principal. En consecuencia, si bien no encontramos relación epidemiológica entre los pacientes, no es posible descartar con seguridad, que se tratase de una transmisión de un clon de *S. epidermidis* entre diferentes pacientes.

### Secuenciación de las cepas ST2

Los datos generados por WGS pueden utilizarse para varios propósitos, entre ellos, en la investigación de los brotes de infección en hospitales y la aparición de clones específicos de patógenos<sup>65,151</sup>. Teniendo en cuenta estos aspectos, en nuestro estudio se realizó WGS con el fin de profundizar en las características de las 22 cepas de *S. epidermidis* ST2. Este ST fue el predominante en cepas IPA y en el cual se incluyeron los posibles clones determinados por PFGE. De esta manera, se mejoró significativamente la resolución del análisis, ya que WGS permite comparar todo el genoma de las cepas. La investigación de la transmisión entre individuos se basa generalmente en la construcción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*-ML) basados en el alineamiento del *core genome* y en la selección de un umbral del

número de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) entre los aislamientos, teniendo en cuenta la información epidemiológica <sup>151</sup>. El enfoque de SNPs puede ofrecernos una resolución muy alta utilizando un genoma de referencia estrechamente relacionado donde se mapean nuestras cepas, y se recomienda en estudios de tipificación de cepas a menor escala y muy cercanas genéticamente entre ellas por su mayor sensibilidad <sup>123</sup>. Una desventaja que presenta esta técnica es la carencia de un consenso de criterios de relación para el análisis de SNPs. Gran parte de la literatura acerca de brotes de *S. aureus* parece estar de acuerdo en que la transmisión puede llevarse a cabo entre dos pacientes si sus cepas difieren en menos de 30 SNPs <sup>65,152</sup>, o si el valor está entre los 23-40 SNPs <sup>151</sup>, o incluso en menos de 50 SNPs <sup>153</sup>, siempre con el apoyo de hallazgos epidemiológicos. Estos valores han sido utilizados dado que se pueden detectar diferencias de hasta 40 SNPs entre cepas de *S. aureus* dentro de un mismo huésped <sup>124,154</sup>. Según Schürch *et al.*, el cual recoge información de varios estudios, el umbral de clonalidad sugerido actualmente en *S. aureus* se considera en  $\leq 15$  SNPs. Es importante destacar que los umbrales de clonalidad propuestos deben considerarse como guías, y no como reglas absolutas, ya que no hay unos criterios establecidos. En nuestro estudio, se probaron diferentes valores de umbral de manera desescalada (100, 50, 25, 20, 17, 15, 12, 10, 5 y  $\leq 2$  SNPs), y pudimos analizar las agrupaciones generadas en cada uno, pasando de la detección de siete *clusters* (I-VII) y dos patrones únicos en 100 SNPs

a un *cluster* y 20 patrones únicos en 2 SNPs. Teniendo en cuenta el umbral recomendado a  $\leq 15$  SNPs por Schürch *et al.*, hemos podido definir cepas estrechamente relacionadas de un mismo paciente y de diferentes pacientes.

En los casos de *clusters* con cepas de un mismo paciente (*clusters* V y VII), podríamos estar hablando de una no curación/recidiva. En el *cluster* VII, con cepas con el mismo antibiograma, el mismo patrón de PFGE, 21 días de diferencia en su aislamiento y 3 SNPs de diferencia, podríamos confirmar la no curación con mayor seguridad. En el *cluster* V, nuestros resultados apoyan la idea de una recidiva ya que solamente hay una diferencia de 9 SNPs entre ambas cepas, aunque cabe la posibilidad de que fuese una reinfección causada por una cepa diferente, porque las cepas tienen diferente antibiograma, diferente patrón de PFGE y las fechas de aislamiento son más lejanas (70 días).

En cuanto a los *clusters* con cepas de diferentes pacientes, nuestros resultados sugieren que las cepas incluidas en los *clusters* I y IV están estrechamente relacionadas y podrían formar parte de dos posibles escenarios de transmisión interhumana. Esta hipótesis aplica sobretodo para las cepas HS37 y HS38 (*cluster* I), pertenecientes a pacientes diferentes, las cuales difieren únicamente en 1 SNP, diferencia menor a las cepas del *cluster* VII (3 SNPs) que parecen ser la misma cepa (caso anterior de la posible no curación en el mismo paciente). Aún y así, las cepas HS37 y HS38 difieren en su antibiograma (eritromicina y clindamicina) y en la presencia de los



genes de resistencia correspondientes (*ermC*, *msrA* y *mphC*), como se ha podido comprobar en el análisis del genoma accesorio que no era completamente idéntico. Todas las cepas incluidas en el *cluster* I se incluyeron en el mismo patrón de PFGE. En cuanto a las fechas de aislamiento, primero se aisló la HS36 el 09/10/2015 (paciente 1), después las cepas HS09 y HS38 el 14/12/2015 (paciente 1 y 2), donde hubo una coincidencia de fechas, y por último la HS37 el 09/06/2016 (paciente 1). Curiosamente, las cepas más lejanas cronológicamente (8 meses), HS36 y HS37 (mismo paciente), se diferencian en 4 SNPs, al igual que la HS36 con la HS38, que se separan por 2 meses aproximadamente, pero son de diferente paciente. La cepa HS09, que comparte el mismo día de aislamiento con la HS38, difiere de esta en 9 SNPs, un número menor a 11 SNPs que es la diferencia con las cepas del mismo paciente (HS36 y HS37). Las cepas incluidas en el *cluster* IV, de diferentes pacientes, solo se diferenciaron en la resistencia a imipenem, en 11 SNPs y en 41 días en la fecha de aislamiento, y se agruparon en el mismo patrón de PFGE.

Como se ha mostrado, los análisis por WGS y PFGE nos proporcionan datos concordantes con la literatura, que no descartan que se haya podido producir una transmisión, aunque en este estudio no se logró determinar alguna relación clínico-epidemiológica para confirmar con total seguridad que se han producido eventos de transmisión cruzada, a diferencia de otros estudios <sup>151,153,154</sup>. Es

posible que ocurriese una contaminación en el momento de la cirugía, sin poder concretarse el mecanismo por el cual se transmitió. Un estudio realizado por Loftus *et al.* identificaron 58 eventos de transmisión clonal de MRSA en quirófano. Estos autores confirmaron que las superficies contaminadas de la piel del paciente, la contaminación de las superficies ambientales y las manos del anestesista, estaban implicados en la transmisión. Por eso, han propuesto un programa que incluye mejoras en la higiene de las manos, descolonización del paciente y limpieza ambiental para minimizar este riesgo <sup>155</sup>. Por lo tanto, a pesar de no encontrar una relación espacio-tiempo clara entre pacientes, nuestros hallazgos sugieren la utilización de la técnica de WGS para estudios de clonalidad, puesto que ha mostrado una mayor sensibilidad y especificidad que el PFGE, como ya ha sido descrito <sup>156,157</sup>. Estudios futuros podrían enfocarse en el análisis por WGS en *S. epidermidis* y facilitar su uso en la práctica diaria, teniendo en cuenta que los costos para su ejecución han disminuido considerablemente a día de hoy, y los resultados se podrían comparar con lo reportado en diferentes localizaciones geográficas. Dada la necesidad de definir un umbral de clonalidad en el enfoque de SNPs en estafilococos, con el fin de decidir si las cepas están estrechamente relacionadas y si ha podido ocurrir transmisibilidad, el incremento en el número de genomas secuenciados y publicados, posiblemente pueda permitir alcanzar esta definición de umbral.

Los posibles clones encontrados en PFGE y WGS pertenecieron al secuenciotipo ST2, el cual fue predominante en las cepas IPA y ausente en los otros dos grupos de cepas PS y CQ. Como es bien sabido, el ST2 se ha relacionado con el ambiente hospitalario y es el ST más extendido que pertenece al complejo clonal 2 (CC2), igualmente, el más ampliamente reportado a nivel mundial <sup>63,72,125,135,158,159</sup>. En el estudio de Miragaia *et al.*, identificaron el CC2 como linaje clonal predominante y las cepas que se incluyeron parecían tener una mejor capacidad de transferencia de material genético por las altas estimaciones de las tasas de recombinación y de adquisición de SCCmec dentro de este CC, lo que soporta la idea de que el CC2 incluya STs relacionados con el ambiente nosocomial como el ST2 <sup>63</sup>. Hellmark *et al.*, encontraron el ST2 y el ST215 con alta prevalencia (45% y 35%, respectivamente) y solamente en las cepas de IPA <sup>160</sup>. En nuestro estudio, el ST215 no ha sido detectado en ninguna población de cepas de *S. epidermidis*, mientras que el ST640 fue encontrado por primera vez en este estudio y, estuvo presente únicamente en la población de cepas de IPA (6; 12%), con un número bajo. Futuros estudios demostrarán si se trata de un secuenciotipo asociado a cepas de infección.

Por el contrario, la gran diversidad de STs encontrados en las cepas comensales indican que son más divergentes que las cepas de IPA, tal y como ha sido reportado previamente por Du *et al.* <sup>158</sup>. Las cepas de campo quirúrgico se han comportado como las cepas

comensales, con una gran variabilidad de STs, sin ninguno predominante. Tampoco se ha encontrado un ST asociado con la comunidad, a diferencia del ST2, que si se ha relacionado con ambiente nosocomial.

Queremos resaltar, que las cepas que han pertenecido al mismo ST, han presentado un patrón de genes y de resistencia antibiótica específico, con algunas variaciones. Por ejemplo, las cepas ST2 fueron positivas para los genes *sesl*, *sdrF*, *ica*, *aap*, *hld* y *IS256* y el tipo *agr-I*, con variaciones en los genes *embp*, *bhp* y ACME, fueron resistentes a cotrimoxazol y la mayoría a penicilina, ciprofloxacino, gentamicina, eritromicina, clindamicina y oxacilina. Estos resultados nos permiten sugerir que las cepas pertenecientes a un mismo secuenciotipo son similares en su contenido genético y en su patrón de resistencia antibiótica, pero no idénticas. Esta comparación es una gran aportación para el estudio dado que la presencia de determinados STs podrían guiar a la diferenciación de las cepas, específicamente por su contenido genético y su patrón de resistencia antibiótica.

### Formación de *biofilm*

La formación de *biofilm* ha sido descrita como un importante factor de virulencia en *S. epidermidis* <sup>52,161</sup>. En nuestro estudio, todas las cepas fueron formadoras de *biofilm*, las proporciones de los niveles

de formación de *biofilm* fueron similares en las tres poblaciones (IPA: F=32%, M=34%, D=34%; CQ: F=24%, M=41,2%, D=35,3%; PS: F=48%, M=28%, D=24%) y no detectamos diferencias significativas entre la formación de *biofilm* entre ellas, a diferencia de otros autores que han demostrado que las cepas clínicas de *S. epidermidis* producen más *biofilm* que las cepas comensales <sup>72,158,162</sup>.

Así como las cepas de IPA, las cepas comensales también pueden contener suficientes mecanismos y factores para ser capaces de producir *biofilm*, y puede ser importante para su crecimiento en la superficie de la piel <sup>163,164</sup>. A pesar de que los *S. epidermidis biofilm* positivo sean frecuentes en infecciones clínicamente significativas, las cepas *biofilm* negativas (no productoras de *biofilm*) también son capaces de causar infección <sup>3</sup>. Por lo tanto, desde nuestro punto de vista y el de otros autores, la formación fenotípica de *biofilm* no puede considerarse una característica que discrimine las cepas comensales de las patógenas en *S. epidermidis* <sup>63,113,135,165</sup>.

Además, aunque el gen *icaA* se ha relacionado con la producción fuerte de *biofilm* <sup>135</sup>, en nuestro caso no detectamos diferencias significativas entre la producción fuerte de *biofilm* y la presencia de *icaA* (sólo encontramos 18 cepas *icaA* positivo de 44 cepas formadoras de *biofilm* fuerte). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios <sup>50,113</sup>. Sin embargo, donde sí encontramos diferencias significativas, fue en la presencia de los genes *sdrF* (77%), *embp* (98%) y *hld* (84%), con la formación fuerte

de *biofilm*. Los genes *sdrF* y *ebp* son genes con un papel importante en la fase de adhesión de la formación del *biofilm*, y podrían estar implicados en una mayor producción. En cuanto al gen *hld*, el cual codifica la toxina  $\delta$ , o modulina y soluble en fenol (PSM $\gamma$ ), tiene varias funciones en *S. epidermidis*, entre ellas, la estructuración del *biofilm* <sup>39</sup>.

La correlación entre la formación fenotípica de *biofilm* y los genes asociados solo ha podido estudiarse en función del grado de formación, ya que no hemos encontrado cepas no formadoras de *biofilm*. Además, hay que tener en cuenta que la técnica para evaluar la formación fenotípica de *biofilm in vitro* es variable entre laboratorios, por lo que la detección de determinantes genéticos relacionados con la formación de *biofilm* y la virulencia de *S. epidermidis* podría resultar menos complicado metodológicamente y más fácil para comparar entre laboratorios.

### **Determinantes genéticos relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles**

La proteína SdrG/Fbe de unión al fibrinógeno en la adhesión inicial, ha sido común en aislados clínicos de *S. epidermidis* <sup>35</sup>. Todas las cepas de nuestro estudio fueron positivas para el gen *sdrG*, de acuerdo con Monk & Archer, donde el gen fue encontrado en el 100% de sus cepas de *S. epidermidis* <sup>166</sup>. No obstante, esto también

incluye la población de cepas comensales, así que el gen *sdrG* no se asocia exclusivamente a la patogenicidad o al comensalismo. De igual manera ocurre con el gen *atIE*, también implicado en la fase de adhesión del *biofilm* además de codificar una autolisina, el gen está presente en todas las cepas de *S. epidermidis* de la colección. Aunque las autolisinas han sido consideradas factores de virulencia, ya que mutantes defectivos del gen *atIE* han manifestado una menor virulencia <sup>167</sup>, en nuestro estudio no podemos definir el gen *atIE* como un factor asociado a las cepas patógenas, porque ha tenido la misma prevalencia en las cepas comensales.

Otra proteína con un papel importante en la adhesión inicial es SdrF, la proteína de unión al colágeno I <sup>30</sup>. La alta prevalencia del gen *sdrF* asociado al *biofilm* en cepas causantes de IPA de *S. epidermidis* ha sido descrita, además de mantener diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con las cepas comensales <sup>164,165</sup>, similar a lo encontrado en nuestro estudio, las cepas IPA (94%) vs las cepas PS (56%). La unión de la proteína SdrF a la queratina o al colágeno facilita la adherencia a las células epiteliales humanas. Esta interacción puede ayudar a la colonización de la piel y las superficies mucosas por *S. epidermidis* y, como resultado, incrementar su potencial para actuar como patógeno <sup>168</sup>.

La proteína de superficie SesI implicada en la adhesión inicial se ha expresado durante una infección <sup>44</sup>, lo que da a pensar que está más

relacionada con cepas virulentas de *S. epidermidis*. Söderquist *et al.* encontraron el gen *sesI* presente en el 50% de los aislamientos clínicos de *S. epidermidis* causantes de infección y ausente en la flora de individuos sanos <sup>45</sup>. Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias significativas de *sesI* entre las poblaciones de cepas de *S. epidermidis*, por el contrario, tuvo una alta prevalencia (88-100%) en todas las poblaciones (IPA: 88%, CQ: 100%, PS: 92%), por lo tanto, no lo consideramos un marcador discriminativo.

En cuanto a la proteína de superficie de unión a la fibronectina (Embp), que interviene tanto en la fase de adhesión como en la de acumulación, existen discrepancias en la literatura acerca de su prevalencia. Mientras que Rohde *et al.* afirman que se encontró el gen *embp* en más del 90% de los aislamientos clínicos de *S. epidermidis* <sup>35</sup>, Ortega-Peña *et al.* encontraron un 84% de cepas comensales *embp* positivas, con diferencias significativas frente a las cepas de infección protésica <sup>72</sup>. En nuestro estudio, en cambio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas del gen *embp* en las cepas de *S. epidermidis* comensales (100%), aunque el porcentaje en las cepas de IPA fue también alto (82%). Esto puede explicarse porque Embp es una proteína multifuncional que tiene un papel importante tanto en los *S. epidermidis* comensales (división celular y adhesión al huésped), como en los patógenos (adhesión a cuerpos extraños y formación de *biofilm*)<sup>35</sup>. El gen *embp* también resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en las cepas CQ,



hecho que no consideramos relevante dado el bajo número de cepas de esta población.

El operón *ica*, compuesto por los genes *icaADBC* e *icaR*, es el encargado de la producción en la fase de acumulación del polisacárido de adhesión intercelular (PIA), un importante componente del *biofilm*. En varios estudios se ha demostrado que el operón *ica* es más prevalente en aislados clínicos de *S. epidermidis* que en aislados comensales de personas sanas <sup>42,135</sup>. Galdbart *et al.* encontraron que el 81,5% de los aislamientos de IPA fueron positivos para el operón *ica*, mientras que el 16,7% fueron aislamientos de la piel de individuos sanos positivos para el operón <sup>169</sup>. La diferencia en nuestro estudio también fue significativa, el 70% de las cepas IPA y el 24% de las cepas comensales fueron positivas para el operón *ica*. Sin embargo, Koskela *et al.* no encontraron diferencias significativas en el operón *ica* comparando ambas poblaciones de *S. epidermidis* <sup>121</sup>. El operón *ica*, involucrado en la producción de PIA, a través de la formación de *biofilm*, induce protección contra cambios osmóticos rápidos cuando se disminuye la tasa de pérdida de agua y rehidratación <sup>164</sup>, lo que puede favorecer la supervivencia en una infección.

En nuestro estudio, predominó la vía de producción de *biofilm* PIA-independiente o dependiente de proteínas más que la PIA-dependiente o dependiente del operón *ica* (45%), ya que la

presencia tanto de *aap* (70%) como *embp* (92%) fue superior al operón *ica* en todas las cepas de *S. epidermidis*. Asimismo, Harris *et al.* encontraron en sus resultados un predominio de la vía PIA-independiente por el gen *aap* en las cepas patogénicas y comensales de *S. epidermidis*, en comparación con el operón *ica* <sup>170</sup>. En contraste, Rohde *et al.* reportaron un predominio de la vía PIA-dependiente, aunque también se utilizaron las dos vías de formación de *biofilm* <sup>35</sup>. Por lo tanto, la frecuencia de las vías de formación de *biofilm* PIA-dependiente y PIA-independiente es variable en *S. epidermidis*.

La proteína asociada al *biofilm* (Bhp) es una proteína multifuncional, lo cual implica su participación en varias fases: adhesión y acumulación. En nuestro estudio, el gen *bhp* ha estado presente, significativamente, en las cepas IPA en comparación con las otras poblaciones de cepas (IPA: 46%, CQ: 24%, PS: 12%). De igual manera, Thomas *et al.* han encontrado un 39% del gen *bhp* en cepas *S. epidermidis* relacionadas con el ambiente nosocomial, aunque no encontraron ningún positivo para el gen en cepas comensales <sup>171</sup>. Post *et al.* asociaron la presencia del gen *bhp* con un mal resultado en el tratamiento de infecciones relacionadas con dispositivos ortopédicos, y como se ha descrito que Bhp promueve la unión primaria a las superficies abióticas, podría ser importante en la fijación rápida al implante <sup>161</sup>.

La toxina más destacada en *S. epidermidis* es la toxina delta, codificada por el gen *hld*. Comúnmente, se asocia la producción de toxinas con la virulencia de una bacteria. En el presente estudio, encontramos lo contrario: el gen *hld* presentó diferencias significativas en las cepas comensales (98%) en comparación con las cepas IPA (66%) y las cepas CQ (82%). Hellmark *et al.* detectaron el gen *hld* en todas las cepas *S. epidermidis*, incluyendo cepas de IPA y cepas comensales<sup>50</sup>. Por lo tanto, no está claro el papel del gen *hld* como factor de virulencia, sino más bien puede ser una indicación de su importancia en la supervivencia de la bacteria<sup>50</sup>. Además, entre las funciones descritas de la toxina delta en *S. epidermidis*, está la de competir con otras especies bacterianas en la piel humana y beneficiar al huésped ya que actúa como una capa adicional de protección contra patógenos de la piel junto con el sistema inmune del huésped<sup>41,50,51,172</sup>. Podría ser un buen motivo para explicar la alta prevalencia del gen *hld* en nuestras cepas comensales.

En el presente estudio, se identificaron los dos sistemas reguladores *Quorum sensing* descritos en *S. epidermidis*: *agr* y *luxS*, encargados de la regulación de la expresión de algunos genes de virulencia<sup>48</sup>. Nuestros resultados muestran ambos sistemas reguladores, ya que se encontraron presentes en todas las cepas, sin detectar diferencias significativas entre las poblaciones. En otros estudios, sí que se detectaron aislados de *S. epidermidis agr* negativos, y de manera más predominante en aislados de infección<sup>42,51</sup>. Cada uno

se centra en la regulación de unos genes determinados, por ejemplo *agr* interviene en la formación de *biofilm* a través de la regulación de la producción de la autolisina AtlE, y *luxS* que regula los genes *ica* y la producción de PIA<sup>48,49</sup>. Por lo tanto, es necesaria la regulación genética por ambos sistemas *quorum sensing* de los genes implicados tanto en la patogenicidad como en la colonización y en la formación de *biofilm* en *S. epidermidis*. De todas maneras, son necesarios más estudios acerca de los sistemas *quorum sensing* en diferentes poblaciones de cepas de *S. epidermidis*, sobretodo de *luxS* que hay menos información.

En relación a la tipificación de *agr*, la cual se determina a partir de la identificación de la secuencia de aminoácidos característica de cada tipo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los tipos y las poblaciones de cepas, en concordancia con otros estudios<sup>173</sup>. El tipo *agr*-III se asoció con las cepas comensales (22%) y el *agr*-IV con las cepas IPA (12%). Hellmark *et al.* no encontraron diferencias significativas entre los tipos *agr* y las poblaciones de cepas IPA y comensales, pero si una predominancia del tipo I en todas las cepas<sup>50</sup>. El tipo de *agr* más prevalente en nuestro estudio también fue *agr*-I, a diferencia de Mertens *et al.*, donde predominaron los tipos de *agr*-II y *agr*-III<sup>42</sup>. Aunque el *agr*-I ha sido descrito como el tipo de *agr* predominante en las cepas de IPA y como un posible factor que destaca el potencial patógeno de *S. epidermidis*<sup>160,173,174</sup>, el *agr*-I estuvo presente de manera similar

en las tres poblaciones de cepas (IPA: 68%, CQ: 59%, PS: 50%). Cabe destacar que el *agr*-IV se encontró solamente en las cepas de IPA (12%), al igual que Harris *et al.* <sup>173</sup>, y el *agr*-III estuvo significativamente presente en las cepas comensales (IPA: 2%, CQ: 6%, PS: 22%). De acuerdo con Mertens *et al.*, la diferencia entre estudios sobre la distribución de los tipos de *agr* en las diferentes poblaciones de cepas de *S. epidermidis*, puede estar relacionada por factores geográficos y ambientales <sup>42</sup>, puesto que los estudios son en diferentes zonas geográficas (Alemania, Reino Unido, Suecia, China, España). Además, Martínez *et al.* estudiaron la asociación entre los tipos *agr* de *S. epidermidis* y su localización en diferentes sitios de la piel, y encontraron el grupo *agr*-I preferentemente en la cabeza, las axilas y las fosas nasales de sujetos sanos <sup>175</sup>, lo que apoya la idea de la presencia de un tipo de *agr* según las condiciones ambientales o fisiológicas de la piel, en este caso.

Un elemento móvil importante en *S. epidermidis* es la secuencia de inserción *IS256*. En *S. epidermidis* se ha demostrado que las cepas clínicas y cepas comensales difieren con respecto a la presencia de ciertos elementos, como las IS, en sus genomas <sup>52</sup>. Koskela *et al.* demostraron que la mayoría de aislados de IPA (81%) contenían la secuencia de inserción *IS256*, y se encontraron diferencias estadísticamente significativas con las cepas comensales (4,2%) en acuerdo con otros estudios <sup>52,121,176</sup>. Nuestros resultados fueron similares (76% IPA vs 4% comensales), por lo tanto, la presencia de

*IS256* fue significativa en las cepas IPA. Según se ha descrito, la inserción de *IS256* junto con otros fenómenos como mutaciones puntuales, transferencia de genes, recombinaciones, y otras inserciones de elementos móviles, pueden inducir cambios en el genoma de *S. epidermidis*, que le aportan a la bacteria una mayor adaptabilidad a diversos ambientes, como es el ambiente hospitalario <sup>121</sup>. Por otro lado, la asociación de *IS256* con la resistencia antimicrobiana ha sido reportada <sup>177</sup>. De acuerdo con la presencia y ausencia del elemento de inserción *IS256*, en nuestro estudio, se observaron diferencias significativas entre la presencia de *IS256* y la resistencia a gentamicina (86%), a penicilina (50%), a eritromicina (51%), a clindamicina (69%), a oxacilina (58%), a ciprofloxacino (83%), a cotrimoxazol (73%) y la rifampicina (78%). La presencia de *IS256* parece tener un papel relevante en la resistencia a varios antibióticos (gentamicina, penicilina, eritromicina, clindamicina, oxacilina, ciprofloxacino, cotrimoxazol y rifampicina), mientras que en la formación de *biofilm* fuerte no resulta ser relevante ya que tuvo una baja prevalencia (27%). En lo que respecta a la resistencia a gentamicina en las cepas positivas para *IS256* (36/42), puede deberse a la asociación de este elemento con el transposón *Tn4001*, implicado en la resistencia a los aminoglucósidos. Por esta razón, esta secuencia de inserción se ha identificado en múltiples copias en el cromosoma de cepas de *S. epidermidis* resistentes a aminoglucósidos <sup>177</sup>.

El otro elemento móvil estudiado en *S. epidermidis*, es el elemento móvil catabólico de arginina (ACME), el cual ha sido más común en aislados comensales que en los de IPA <sup>57</sup>, al igual que en nuestro estudio, que se encontraron diferencias significativas (78% IPA vs 100% PS). De acuerdo con nuestro estudio, otros autores apoyan la idea de que ACME no está asociado con la patogenicidad, sino con la colonización, la supervivencia y la propagación de *S. epidermidis* dentro de la comunidad <sup>57,135,158</sup>. Esto puede ser debido a que ACME codifica factores metabólicos que pueden intervenir en la adaptación al nicho ecológico. El operón *arc*, que contiene ACME, controla diferentes procesos, incluida la homeostasis del pH que facilita la supervivencia en nichos ecológicos con altas concentraciones de ácidos orgánicos, como sería en la piel. Por esta razón, ACME podría tener una importancia en los *S. epidermidis* comensales, ya que la osmotolerancia y el estrés salino son condiciones típicas que se encuentran los estafilococos colonizantes de la piel humana <sup>28</sup>.

Respecto a la tipificación del elemento móvil ACME, la cual se realizó mediante la detección de los operones *arc*, *opp3* y *kdp*, generalmente predominó el ACME-IV (62/117; 53%), a diferencia de otros estudios donde predominó el ACME-I <sup>136</sup>. Eso es debido a que recientemente se han descrito nuevos tipos (ACME IV-VI) que antes los habrían podido confundir con los que estaban descritos en ese momento (ACME I-III). Por esta razón, son necesarios más estudios

con la nueva tipificación de ACME, la cual se basa en añadir la detección de *kdp*, además de la de *arc* y *opp3* <sup>53</sup>.

Una gran diferencia entre las cepas de infección y las cepas comensales es que las primeras han tenido que superar unas condiciones ambientales diferentes ya que han sobrevivido y colonizado un nuevo nicho subcutáneo <sup>113</sup>. Para ello, estas cepas deben estar dotadas de genes que las diferencien de las cepas comensales que no causan infección. En nuestro estudio, las cepas ST2 presentes en IPA fueron multirresistentes y positivas en operón *ica*, *IS256*, *sdrF*, *bhp* y *mecA*. La combinación de estos determinantes de patogenicidad podrían contribuir a la adaptación y la supervivencia de los clones patogénicos, como el ST2, a las condiciones específicas fisiológicas durante la infección, superando así la barrera de la profilaxis antibiótica y las defensas del huésped <sup>19,113,135,158,171,178</sup>. Esta posibilidad soporta el modelo de clones patogénicos propuesto por Méric *et al.* <sup>113</sup>, el cual explica como una cepa comensal de *S. epidermidis* puede llegar a ser un patógeno. Los clones que han adquirido determinantes patogénicos que promueven la infección, representan una subpoblación de la microbiota de la piel que pueden proliferar en la sangre, a diferencia de otras cepas comensales. Adicionalmente, Espadinha *et al.* demostraron que los aislados de *S. epidermidis* de infección se adaptaron mejor a un rango de concentraciones de salinidad y pH ácidos y tuvieron una capacidad superior para resistir a los



antibióticos y a formar *biofilm* en sangre, lo que sugiere una mejor supervivencia en un rango más amplio de nichos que los aislados colonizantes <sup>164</sup>.

En las cepas comensales, los genes *embp*, *hld* y ACME fueron altamente significativos. Esto podría explicarse por la importancia de estos marcadores en la supervivencia bacteriana a las condiciones de la superficie de la piel y la mayor capacidad de *S. epidermidis* para colonizar <sup>50</sup>. Espadinha *et al.* diferenciaron los aislados colonizantes de los de infección en características como que no soportaban tan fácilmente las condiciones de acidez y ósmosis, y se asociaron a funciones relacionadas con los ácidos grasos libres, el metabolismo lipídico, el ambiente microaeróbico y la interacción interespecies (*Propionibacterium* spp.). Es decir, las cepas comensales parecen tener cualidades que faciliten su adaptación y supervivencia en un ambiente microaerófilo y rico en lípidos, como los folículos pilosos y las glándulas sebáceas. En cambio, las cepas causantes de IPA se adaptaron mejor a condiciones cambiantes y extremas osmóticas y de pH de la superficie de la piel, lo que quiere decir que seguramente ocupen una superficie más amplia de la piel <sup>164</sup>. Estas diferencias vienen dadas por el contenido genético que fue diferente en cada población de cepas de *S. epidermidis*, asociándose genes a diferentes funciones biológicas <sup>164</sup>, lo que apoya las diferencias genéticas encontradas en nuestro estudio.

## Secuenciación de las cepas ST2

El estudio de asociación del genoma completo (GWAS) para determinar si hay genes que se asocian a la patogenicidad del ST2 mediante la herramienta Scoary, no pudo demostrar diferencias significativas a nivel de contenido genético de las cepas ST2 con otros STs. Cabe mencionar que este análisis se utiliza para la asociación de un fenotipo de interés a la presencia/ausencia de genes, y la utilización del ST2 como un fenotipo puede no ser una aproximación adecuada.

Por otro lado, el análisis GWAS mediante el programa pyseer nos sugirió que los genes *sprt* y *duf1672*, la ADN primasa y las secuencias de inserción *IS1182* y *IS110*, podrían estar asociados a la patogenicidad del ST2 al presentar un mayor número de *k*-mers. Serán necesarios otros estudios para determinar si se trata de genes implicados en la patogenicidad de las cepas ST2 y si tienen una función específica que favorezca la diseminación de este clon patogénico de *S. epidermidis*.

Del mismo modo que con los genes de resistencia, la detección de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles que hemos discutido hasta ahora, se realizó por PCR. Así que quisimos comparar estos resultados con los obtenidos

por WGS de las cepas de *S. epidermidis* ST2, y encontramos discrepancias entre las técnicas en cuatro genes (*embp*, *sesl*, *bhp* y la secuencia de inserción *IS256*) en algunas cepas. Cabe decir que la base de datos de VirulenceFinder no fue una herramienta útil para nuestro estudio ya que solamente detectó el elemento móvil ACME. Podría ser que el resto de genes de virulencia no estén presentes en la base de datos o que la búsqueda no sea totalmente eficaz para *S. epidermidis*, ya que, en la pantalla principal, a la hora de seleccionar la especie, se indican únicamente *Listeria*, *S. aureus*, *E. coli* y *Enterococcus*. Aún y así, pudimos llevar a cabo la PCR *in silico* para la detección de los genes. La detección de genes por PCR y no por WGS, podría explicarse por falsos positivos en la PCR, subpoblaciones que contengan o no el gen (pérdida de plásmidos y/o elementos móviles), o que el gen no esté completo y se amplifique por PCR pero al ser un fragmento corto no se detecte por WGS.

Estos resultados nos sugieren el uso de más de un sistema de análisis tanto para estudios de epidemiología como para la detección de genes en *S. epidermidis*, incluyendo PCR y WGS, y dentro de esta última, varios softwares bioinformáticos.



# 7. Conclusiones





1. Las cepas aisladas de infección de prótesis fueron más resistentes a los antibióticos, seguidas de las cepas aisladas del campo quirúrgico y, en menor medida, las cepas comensales de personas sanas.
2. Mediante MLST, se han detectado una gran variedad de STs, incluyendo 24 STs nuevos. Las cepas comensales presentan una mayor diversidad de STs que las cepas de infección protésica.
3. Mediante las técnicas PFGE y WGS se detectaron posibles eventos de transmisión cruzada entre diferentes pacientes, pero no se encontraron relaciones clínico-epidemiológicas para poder confirmarse.
4. Existen clones circulantes de *S. epidermidis*, como el ST2, que se diseminan mundialmente.
5. La formación de *biofilm* no es un factor discriminativo entre las cepas de infección de prótesis articular y las cepas comensales de *S. epidermidis*, ya que todas las cepas del estudio fueron productoras de *biofilm*.
6. Las cepas de *S. epidermidis* provenientes de infección de prótesis articular son distintas a las cepas comensales que se encuentran en la piel de una persona sana. Las cepas de *S. epidermidis* de infección han adquirido elementos genéticos que las diferencian de las cepas comensales y las caracterizan como patógenos para el ser humano, incluyendo la presencia del secuenciotipo ST2, el operón *ica*,

la secuencia de inserción *IS256*, los genes *sdrF*, *bhp*, *mecA* y el fenotipo de multirresistencia.

7. La nueva población de cepas estudiada provenientes del campo quirúrgico, es una población control más adecuada al ser cepas capaces de llegar al campo quirúrgico y no provocar una infección. De hecho, se han comportado de manera similar a las cepas comensales, con excepción de que fueron más resistentes a antibióticos.
8. Las cepas comensales aisladas de personas sanas, se caracterizan por la presencia de unos genes determinados, como *ACME*, *embp* y *hld*, los cuales facilitan su adaptación y supervivencia a las condiciones de la piel humana.
9. Las cepas de *S. epidermidis* que pertenecen a un mismo ST, contienen un patrón de genes y de resistencia antibiótica similar, con alguna variación.
10. Es recomendable el uso de WGS en estudios de clonalidad y detección de genes u otros elementos genéticos en *S. epidermidis*, adicionalmente a las técnicas de PFGE y PCR, ya que proporciona una mayor sensibilidad y especificidad en los resultados.





# 8. Referencias





1. Masaracchio, M., Hanney, W. J., Liu, X., Kolber, M. & Kirker, K. Timing of rehabilitation on length of stay and cost in patients with hip or knee joint arthroplasty: A systematic review with meta-analysis. *PLoS One* **12**, 1–22 (2017).
2. Gomez-Urena, E. O., Tande, A. J., Osmon, D. R. & Berbari, E. F. Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: Cultures, Biomarker and Criteria. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **31**, 219–235 (2017).
3. Moriarty, T. F., Zaat, S. A. J. & Busscher, H. J. Biomaterials associated infection: Immunological aspects and antimicrobial strategies. *Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies.* **2**, 25–56 (2013). doi:10.1007/978-1-4614-1031-7
4. Kapadia, B. H. *et al.* Periprosthetic joint infection. *Lancet* **387**, 386–394 (2016).
5. Runner, R. P. *et al.* Prosthetic Joint Infection Trends at a Dedicated Orthopaedics Specialty Hospital. *Adv. Orthop.* **2019**, 1–9 (2019).
6. Peel, T. N., Cheng, A. C., Buising, K. L. & Choong, P. F. M. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2386–2391 (2012).
7. Parvizi, J., Fassihi, S. C. & Enayatollahi, M. A. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection Following Hip and Knee

- Arthroplasty. *Orthop. Clin. North Am.* **47**, 505–515 (2016).
8. Davidson, D. J., Spratt, D. & Liddle, A. D. Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT Open Rev.* **4**, 633–639 (2019).
  9. Sandra Pulido. Más edad, más prótesis: el coste de las sustituciones de cadera y rodilla. *Rev. Española Econ. la Salud* **14**, 36–41 (2019).
  10. Parvizi, J. *et al.* New definition for periprosthetic joint infection: From the workgroup of the musculoskeletal infection society. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **469**, 2992–2994 (2011).
  11. Gencat. Programa de vigilància de les infeccions nosocomials als hospitals de Catalunya (VINCat). *General. Catalunya* **2018**, 4–154 (2018).
  12. Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid. *Informe epidemiológico de vigilancia de la infección de localización quirúrgica 2017-2018.* (2018).
  13. Tande, A. J. & Patel, R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 302–345 (2014).
  14. Parvizi, J. & Gehrke, T. Definition of periprosthetic joint infection. *J. Arthroplasty* **29**, 1331 (2014).
  15. Izakovicova, P., Borens, O. & Trampuz, A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev.* **4**, 482–494 (2019).
  16. Osmon, D. R. *et al.* Diagnosis and management of prosthetic

- joint infection: Clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1–25 (2013).
17. 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 articular en un hospital de referencia. *Cir. Cir.* **83**, 371–377 (2015).
  18. Benito, N. *et al.* Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 8 (2016).
  19. Christensen, G. J. M. & Brüggemann, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef. Microbes* **5**, 201–215 (2014).
  20. Grice, E. A. *et al.* Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*. **324**, 1190-1192 (2009). doi:10.1126/science.1171700
  21. Chen, Y. E. & Tsao, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **69**, 143-155 (2013). doi:10.1016/j.jaad.2013.01.016
  22. Glinel, K., Behrens, A., Langer, R. S., Jaklenec, A. & Jonas, A. M. Nanofibrillar Patches of Commensal Skin Bacteria. *Biomacromolecules*. **20**, 102-108 (2018). doi:10.1021/acs.biomac.8b00735

23. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870-926 (2014).
24. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 555–567 (2009).
25. Vasileiou, N. G. C. *et al.* Role of staphylococci in mastitis in sheep. *J. Dairy Res.* **86**, 254–266 (2019).
26. Saber, H., Jasni, A. S., Jamaluddin, T. Z. M. T. & Ibrahim, R. A review of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types in coagulase-negative staphylococci (CoNS) species. *Malaysian Journal of Medical Sciences* **24**, 7-18 (2017).
27. Garza-gonzalez, E., R F N-otero, R. M., Llaca-d Az, J. M. & D E Rodriguez-noriega, A. N. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol Infect.* **138**, 645-654 (2017). doi:10.1017/S0950268809991361
28. Heilmann, C., Ziebuhr, W. & Becker, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 1071-1080 (2018). doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.012
29. Kaspar, U. *et al.* The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. **18**, 2130–2142 (2016).
30. Büttner, H., Mack, D., Rohde, H. & Lee, C. Structural basis of

- Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* **5**, 14 (2015). doi:10.3389/fcimb.2015.00014
31. Drago, L. *et al.* Role and antimicrobial resistance of staphylococci involved in prosthetic joint infections. *Int. J. Artif. Organs* **37**, 414–421 (2014).
  32. Newsom, S. W. B. Ogston's coccus. *J. Hosp. Infect.* **70**, 369–372 (2008).
  33. Namvar, A. E. *et al.* Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg. Infect. Control* **9**, 23 (2014).
  34. Eladli, M. G. *et al.* Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients and healthy students comparing with antibiotic-resistant bacteria isolated from pasteurized milk. *Saudi J. Biol. Sci.* **26**, 1285–1290 (2019).
  35. 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* **28**, 1711–1720 (2007).
  36. Massey, R. C., Horsburgh, M. J., Lina, G., Höök, M. & Recker, M. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: A role for host-to-host transmission? *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 953–958 (2006).
  37. Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J. Bases moleculares de la



- adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**, 48–55 (2008).
38. Azeredo, J. *et al.* Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 313–351 (2017).
  39. Otto, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* **64**, 175–188 (2013).
  40. Brescó, M. S. *et al.* Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. *Frontiers in Microbiology* **8**, (2017).
  41. von Eiff, C., Peters, G. & Heilmann, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet. Infect. Dis.* **2**, 677–685 (2002).
  42. Mertens, A. & Ghebremedhin, B. Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devices. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. **3**, 111–119 (2013).
  43. Ortega-Peña, S., Martínez-García, S., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Díaz, M. E. & Cancino-Díaz, J. C. Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 771–784 (2020).
  44. Fey, P. D. & Olson, M. E. Current Concepts of *S. epidermidis*

- biofilms. *Future Microbiol.* **5**, 917–933 (2011).
45. Söderquist, B. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* surface protein I (SesI): A marker of the invasive capacity of *S. epidermidis*? *J. Med. Microbiol.* **58**, 1395–1397 (2009).
  46. Le, K. Y., Park, M. D. & Otto, M. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *Front. Microbiol.* **9**, 1–8 (2018).
  47. Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Microbiol. Spectr.* **6**, (2018).
  48. Kong, K. F., Vuong, C. & Otto, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology* (2006).  
doi:10.1016/j.ijmm.2006.01.042
  49. Xu, L. *et al.* Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **74**, 488–496 (2006).  
doi:10.1128/IAI.74.1.488-496.2006
  50. Hellmark, B., Soderquist, B., Unemo, M. & Nilsson-Augustinsson, A. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, *agr* type, biofilm production, and epidemiology. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 32–39 (2013).
  51. Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. a, Fischer, E. R. & Otto, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in

- Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **188**, 706–718 (2003).
52. Kozitskaya, S. *et al.* Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4751–4757 (2005). doi:10.1128/JCM.43.9.4751-4757.2005
  53. O'Connor, A. M., McManus, B. A. & Coleman, D. C. First description of novel arginine catabolic mobile elements (ACMEs) types IV and V harboring a *kdp* operon in *Staphylococcus epidermidis* characterized by whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* **61**, 60–66 (2018).
  54. O'Connor, A. M. *et al.* Significant enrichment and diversity of the Staphylococcal arginine catabolic mobile element ACME in *Staphylococcus epidermidis* isolates from subgingival peri-implantitis sites and periodontal pockets. *Front. Microbiol.* **9**, 1–15 (2018).
  55. Miragaia, M. *et al.* Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One* **4**, e7722 (2009).
  56. McManus, B. A., O'Connor, A. M., Egan, S. A., Flanagan, P. R. & Coleman, D. C. First description of arginine catabolic mobile element (ACME) type VI harboring the *kdp* operon only in *Staphylococcus epidermidis* using short and long read whole genome sequencing: Further evidence of ACME diversity. *Infect. Genet. Evol.* **71**, 51–53 (2019).

57. Hellmark, B., Berglund, C., Nilsson-Augustinsson, Å., Unemo, M. & Söderquist, B. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and arginine catabolic mobile element (ACME) in *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **32**, 691-697 (2013). doi:10.1007/s10096-012-1796-2
58. Chen, L. *et al.* Multiplex real-time PCR for rapid staphylococcal cassette chromosome *mec* typing. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3692-3706 (2009). doi:10.1128/JCM.00766-09
59. Conlan, S. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol.* **13**, R64 (2012). doi:10.1186/gb-2012-13-7-r64
60. Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75 (1984).
61. Tenover, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239 (1995).
62. Thomas, J. C. *et al.* Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 616-619 (2007).
63. Miragaia, M., Thomas, J. C., Couto, I., Enright, M. C. & De Lencastre, H. Inferring a population structure for

- Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **189**, 2540–2552 (2007).
64. Rodríguez-Santiago, B. & Armengol, L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenat.* **23**, 56–66 (2012).
  65. Humphreys, H. & Coleman, D. C. Contribution of whole-genome sequencing to understanding of the epidemiology and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* **102**, 189–199 (2019).
  66. Kyle S, M. & Ariel M, T. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 Chromosome and Plasmids, Generated by Long-Read Sequencing. *Genome Announc.* **5**, 4–5 (2017).
  67. Galac, M. R. *et al.* Complete genome sequence of *Staphylococcus epidermidis* 1457. *Genome Announc.* **5**, 15–17 (2017).
  68. Galac, M. R. *et al.* Complete Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* CSF41498 . *Microbiol. Resour. Announc.* **8**, 14–15 (2019).
  69. Gill, S. R. *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.* **187**, 2426–2438 (2005).
  70. Davenport, K. W. *et al.* Complete Genome Assembly of

- Staphylococcus epidermidis* AmMS 205. *Genome Announc.* **2**, 5–6 (2014).
71. Zhang, Y. Q. *et al.* Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577–1593 (2003).
72. Ortega-Peña, S. *et al.* *sesA*, *sesB*, *sesC*, *sesD*, *sesE*, *sesG*, *sesH*, and *embp* genes are genetic markers that differentiate commensal isolates of *Staphylococcus epidermidis* from isolates that cause prosthetic joint infection. *Infect. Dis. (Auckl)*. **51**, 435-445 (2019).  
doi:10.1080/23744235.2019.1597276
73. Salih, L. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* isolates from nares and prosthetic joint infections are mupirocin susceptible. *J. Bone Jt. Infect.* **3**, 1–4 (2018).
74. Lourtet-Hascoët, J. *et al.* Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections. *Epidemiol. Infect.* **146**, 1771–1776 (2018).
75. Shore, A. C. & Coleman, D. C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology* **303**, 350-359 (2013). doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.002
76. Huda, S., J, A. S. & Maztura, T. Z. Review Article A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* ( SCC *mec* ) Types in Coagulase-Negative Staphylococci ( CoNS ) Species. **24**, 7–

- 18 (2017).
77. Ito, T. *et al.* Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4961–4967 (2009).
  78. Kondo, Y. *et al.* Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: Rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 264–274 (2007). doi:10.1128/AAC.00165-06
  79. Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **27**, 44–52 (2009).
  80. Waxman, D. J. & Strominger, J. L. Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics1. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 825–869 (1983).
  81. Schwarz, S. *et al.* Antimicrobial Resistance among Staphylococci of Animal Origin. *Microbiol. Spectr.* **6**, 1–29 (2018).
  82. Feßler, A. T., Wang, Y., Wu, C. & Schwarz, S. Mobile lincosamide resistance genes in staphylococci. *Plasmid* **99**, 22–31 (2018).
  83. Morosini, M. I., Cercenado, E., Ardanuy, C. & Torres, C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enfermedades Infecciosas y*

*Microbiologia Clinica* **30** (2012).

doi:10.1016/j.eimc.2011.09.009

84. Miragaia, M. Factors contributing to the evolution of Meca-mediated  $\beta$ -lactam resistance in staphylococci: Update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Front. Microbiol.* **9**, 1–16 (2018).
85. Lozano, C. & Torres, C. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **35**, 2–8 (2017).
86. Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. & Kriegeskorte, A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The ‘mec alphabet’ with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 794–804 (2014).
87. Feßler, A. T., Wang, Y., Wu, C. & Schwarz, S. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. *Plasmid* **99**, 2–10 (2018).
88. Juda, M., Chudzik-Rzad, B. & Malm, A. The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 155-160 (2016). doi:10.1590/0074-02760150356
89. Bouchami, O., Achour, W. & Ben Hassen, A. Prevalence of resistance phenotypes and genotypes to macrolide,



lincosamide and streptogramin antibiotics in gram-positive cocci isolated in tunisian bone marrow transplant center.

*Pathol. Biol.* **59**, 199-206 (2011).

doi:10.1016/j.patbio.2009.03.010

90. Shore, A. C. *et al.* First Report of *cfr* -Encoding Plasmids in the Pandemic Sequence Type (ST) 22 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type-IV Clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, AAC.02949-15 (2016).
91. Montazeri, E. A. *et al.* Investigation of SCC *mec* types I – IV in clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in Ahvaz , Southwest Iran. *Biosci Rep.* **40**, BSR20200847 (2020). doi:10.1042/BSR20200847
92. Mendes, R. E. *et al.* Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2329–2335 (2010).
93. Perez-Jorge, C., Gomez-Barrena, E., Horcajada, J.-P., Puig-Verdie, L. & Esteban, J. Expert Opinion on Pharmacotherapy Drug treatments for prosthetic joint infections in the era of multidrug resistance Drug treatments for prosthetic joint infections in the era of multidrug resistance. *Expert Opin. Pharmacother.* **17**, 1233–1246 (2016).
94. Cheng Li, Nora Renz, Andrej Trampuz. Management of prosthetic joint infection. *Hip Pelvis* **30**, 138–146 (2018).

95. Ariza, J. *et al.* Executive summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **35**, 189–195 (2017).
96. Hellmark, B., Unemo, M., Nilsson-Augustinsson, Å. & Söderquist, B. Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 238–244 (2009).
97. Rosenberger, L. H., Politano, A. D. & Sawyer, R. G. The surgical care improvement project and prevention of post-operative infection, including surgical site infection. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **12**, 163–168 (2011).
98. Maldonado, N., Robledo, C. & Robledo, J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio* **22**, 35–45 (2018).
99. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
100. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2017). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for*

- interpretation of MICs and zone diameters.* (2017).
101. Schwarz, S. *et al.* Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* **141**, 1–4 (2010).
  102. Goering, R. V & Fey, P. D. Pulsed Field Gel Electrophoresis of *Staphylococcus epidermidis*. in *Staphylococcus Epidermidis: Methods and Protocols* (ed. Fey, P. D.) **1106**, 55–60 (2014). doi:10.1007/978-1-62703-736-5\_4
  103. Miragaia, M. *et al.* Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: Proposal for clone definition. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 118-29 (2008). doi:10.1128/JCM.01685-07
  104. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, S. B. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J. Bacteriol.* **186**, 1518–1530 (2004). doi:10.1128/JB.186.5.1518
  105. Rossen, J. W. A., Friedrich, A. W. & Moran-Gilad, J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 355–360 (2018).
  106. Marcel Martín. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17** (2013). doi:10.14806/ej.17.1.200
  107. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Unicycler:

- Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* **13**, 1–22 (2017).
108. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068–2069 (2014).
  109. Page, A. J. *et al.* Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* **31**, 3691–3693 (2015).
  110. Croucher, N. J. *et al.* Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* **43**, e15 (2015).
  111. Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
  112. Hadfield, J. *et al.* Phandango: An interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics* **34**, 292–293 (2018).
  113. Méric, G. *et al.* Disease-associated genotypes of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis*. *Nat. Commun.* **9**, 5034 (2018).
  114. San Millán, R. M., Martínez-Ballesteros, I., Rementeria, A., Garaizar, J. & Bikandi, J. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Res. Notes* **6**, 2–5 (2013).
  115. Bikandi, J., Millán, R. S., Rementeria, A. & Garaizar, J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **20**, 798–799

- (2004).
116. Lees, J. The background of bacterial GWAS. 1–30 (2017).  
doi:10.6084/m9.figshare.5550037.v1
  117. Brynildsrud, O., Bohlin, J., Scheffer, L. & Eldholm, V. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biol.* **17**, 1–9 (2016).
  118. Lees, J. A., Galardini, M., Bentley, S. D., Weiser, J. N. & Corander, J. pyseer: A comprehensive tool for microbial pangenome-wide association studies. *Bioinformatics* **34**, 4310–4312 (2018).
  119. Seyedi-Marghaki, F., Kalantar-Neyestanaki, D., Saffari, F., Hosseini-Nave, H. & Moradi, M. Distribution of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Molecular Analysis of the Coagulase Gene in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* **25**, 47–53 (2019).
  120. Fey, P. D. *Staphylococcus Epidermidis*: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* **1106** (2014).
  121. Koskela, A., Nilsson-Augustinsson, A., Persson, L. & Soderquist, B. Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 655–660 (2009).
  122. Juárez-Verdayes, M. A. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* with the *icaA*-/*icaD*-/IS256- genotype and protein or

- protein/extracellular-DNA biofilm is frequent in ocular infections. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1579-1587 (2013).  
doi:10.1099/jmm.0.055210-0
123. Schürch, A. C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J. L. & Goering, R. V. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 350–354 (2018).
  124. Golubchik, T. *et al.* Within-Host Evolution of *Staphylococcus aureus* during Asymptomatic Carriage. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).
  125. Cherifi, S. *et al.* Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bloodstream infections and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. **13**, 20 (2014). doi:10.1186/1476-0711-13-20
  126. Ariza, J. *et al.* Executive summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **35**, 189-195 (2017).  
doi:10.1016/j.eimc.2016.08.012
  127. Miragaia, M., Couto, I. & De Lencastre, H. Genetic Diversity among Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb. DRUG Resist.* **11**, 83-93 (2005).

doi:10.1089/mdr.2005.11.83

128. Kim, E.-S. *et al.* Chamaecyparis obtusa Essential Oil Inhibits Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Expression of Virulence Factors. *J. Med. Food* **18**, 810–817 (2015).
129. Cosimi, R. A., Beik, N., Kubiak, D. W. & Johnson, J. A. Ceftaroline for severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A systematic review. *Open Forum Infect. Dis.* **4**, 1–7 (2017).
130. Park, K. H., Greenwood-Quaintance, K. E. & Patel, R. In vitro activity of ceftaroline against staphylococci from prosthetic joint infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **84**, 141–143 (2016).
131. Isnard, C. *et al.* In vitro activity of novel anti-MRSA cephalosporins and comparator antimicrobial agents against staphylococci involved in prosthetic joint infections. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **13**, 221–225 (2018).
132. Duployez, C., Wallet, F., Migaud, H., Senneville, E. & Loiez, C. Ceftobiprole: A potential empirical post-operative monotherapy in prosthetic joint infections. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **19**, 1–7 (2020).
133. Fernandes dos Santos, F. *et al.* Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *J. Dairy Sci.* **99**, 1374–1382 (2016).
134. Faria, N. A. *et al.* Nasal Carriage of Methicillin Resistant

- Staphylococci. *Microb. DRUG Resist.* **20**, 108-117 (2014).  
doi:10.1089/mdr.2013.0197
135. Cherifi, S. *et al.* Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1541–1547 (2013).
  136. Svensson, K., Hellmark, B. & Söderquist, B. Characterization of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures from neonates during three decades. *Apmis* **119**, 885–893 (2011).
  137. Hanssen, A., Kjeldsen, G. & Sollid, J. U. E. Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome. *Society* **48**, 285–296 (2004).
  138. Hosseinkhani, F., Buirs, M. T., Jabalameli, F., Emaneini, M. & Van Leeuwen, W. B. High diversity in SCCmec elements among multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains originating from paediatric patients; characterization of a new composite island. *J. Med. Microbiol.* **67**, 915–921 (2018).
  139. Ito, T. *et al.* Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome. *Society* **45**, 1323–1336 (2001).
  140. Zhang, K., McClure, J.-A., Elsayed, S., Louie, T. & Conly, J. M. 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 (2005).
141. Deplano, A. *et al.* National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 1815–1819 (2016). doi:10.1093/jac/dkw086
  142. McManus, B. A. *et al.* Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) genes and antimicrobial resistance amongst *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infections in humans and companion animals. *PLoS One* **10**, e0138079 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0138079
  143. Gómez-Sanz, E. *et al.* Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**, 1269–1277 (2010).
  144. Águila-Arcos, S. *et al.* Biofilm-forming clinical *Staphylococcus* isolates harbor horizontal transfer and antibiotic resistance genes. *Front. Microbiol.* **8**, 1–12 (2017).
  145. Klibi, A., Maaroufi, A., Torres, C. & Jouini, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **52**, 930–935 (2018).

146. Bender, J. *et al.* Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 1630–1638 (2014).
147. Lincopan, N., de Almeida, L. M., Elmor de Araújo, M. R. & Mamizuka, E. M. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 281–282 (2009).
148. Hong, T., Li, X., Wang, J., Sloan, C. & Cicogna, C. Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3277–3280 (2007).  
doi:10.1128/JCM.02048-06
149. Lamarre, J. *et al.* The genetic environment of the *cfr* gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1173–1179 (2013).
150. Pfaller, M. A., Mendes, R. E., Streit, J. M., Hogan, P. A. & Flamm, R. K. Five-Year Summary of In Vitro Activity and Resistance Mechanisms of Linezolid against Clinically Important Gram- Positive Cocci in the United States from the LEADER Surveillance Program (2011 to 2015). *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e00609-17 (2017).  
doi:10.1128/AAC.00609-17
151. Hall, M. D. *et al.* Improved characterisation of MRSA

- transmission using within-host bacterial sequence diversity. *Elife* **8**, 1–22 (2019).
152. Azarian, T. *et al.* Whole-Genome Sequencing for Outbreak Investigations of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Neonatal Intensive Care Unit: Time for Routine Practice. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 777–785 (2015).
  153. Coll, F. *et al.* Longitudinal genomic surveillance of MRSA in the UK reveals transmission patterns in hospitals and the community. *Sci. Transl. Med.* **9**, 1–19 (2017).
  154. Price, J. R. *et al.* Whole-genome sequencing shows that patient-to-patient transmission rarely accounts for acquisition of *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 609–618 (2014).
  155. Loftus, R. W., Dexter, F. & Robinson, A. D. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has greater risk of transmission in the operating room than methicillin-sensitive *S aureus*. *Am. J. Infect. Control* **46**, 520–525 (2018).
  156. Roe, C. C. *et al.* Whole genome SNP typing to investigate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a health-care provider as the source of multiple surgical site infections. *Hereditas* **153**, 11 (2016).
  157. Long, S. W., Beres, S. B., Olsen, R. J. & Musser, M. Absence of Patient-to-Patient Intrahospital Transmission of. **5**, 1–10 (2014).

158. Du, X. *et al.* Molecular Analysis of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Community and Hospital Environments in China. *PLoS One* **13**, e62742 (2013).  
doi:10.1371/journal.pone.0062742
159. Salgueiro, V. C., Iorio, N. L. P., Ferreira, M. C., Chamon, R. C. & dos Santos, K. R. N. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. *BMC Microbiol.* **17**, 15 (2017).
160. Hellmark, B., Söderquist, B., Unemo, M. & Nilsson-Augustinsson, Å. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, *agr* type, biofilm production, and epidemiology. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 32-39 (2013). doi:10.1016/j.ijmm.2012.11.001
161. Post, V. *et al.* Comparative Genomics Study of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Orthopedic-Device-Related Infections Correlated with Patient Outcome. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 3089–3103 (2017).
162. Fariñ Margarita Samudio Letizia Carpinelli Martin Nentwich Herminia Mino de Kaspar, N. M. Methicillin resistance and biofilm production of *Staphylococcus epidermidis* isolates from infectious and normal flora conjunctiva. *Int. Ophthalmol.* **37**, 819-825 (2017). doi:10.1007/s10792-016-0339-8
163. de Araujo, G. L. *et al.* Commensal isolates of methicillin-

- resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 855–864 (2006).
164. Espadinha, D. *et al.* Distinct phenotypic and genomic signatures underlie contrasting pathogenic potential of *Staphylococcus epidermidis* clonal lineages. *Front. Microbiol.* **10**, 1–17 (2019).
  165. Salgueiro, V. C., Iorio, N. L. P., Ferreira, M. C., Chamon, R. C. & Dos Santos, K. R. N. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. *BMC Microbiol.* **17**, 15 (2017).
  166. Monk, A. B. & Archer, G. L. Use of outer surface protein repeat regions for improved genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 730–735 (2007).
  167. Heilmann, C. *et al.* Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**, 2769–2778 (2003). doi:10.1099/mic.0.26527-0
  168. Trivedi, S. *et al.* The Surface Protein SdrF Mediates *Staphylococcus epidermidis* Adherence to Keratin. *J. Infect. Dis.* **215**, 1846–1854 (2017).
  169. Galdbart, J., Allignet, J., Tung, H., Rydèn, C. & El Solh, N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* Markers Discriminating between Skin-Flora Strains and Those Responsible for Infections of Joint Prostheses. *J. Infect. Dis.*

- 182**, 351–355 (2000).
170. Harris, L. G. *et al.* Biofilm morphotypes and population Structure among *Staphylococcus epidermidis* from commensal and clinical samples. *PLoS One* **11**, e0151240 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0151240
  171. Thomas, J. C., Zhang, L. & Robinson, D. A. Differing lifestyles of *Staphylococcus epidermidis* as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. *Infect. Genet. Evol.* **22**, 257–264 (2014). doi:10.1016/j.meegid.2013.06.020
  172. Cogen, A. L. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial  $\delta$ -toxin (phenol-soluble modulins- $\gamma$ ) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS One* **5**, 1–7 (2010).
  173. Harris, L. G. *et al.* Limitations in the use of PSM $\gamma$ , *agr*, RNAlII, and biofilm formation as biomarkers to define invasive *Staphylococcus epidermidis* from chronic biomedical device-associated infections. *Int. J. Med. Microbiol.* **307**, 382–387 (2017).
  174. Li, M. *et al.* Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *J. Med. Microbiol.* **53**, 545–549 (2004).
  175. Martínez-García, S. *et al.* Competition/antagonism associations of biofilm formation among *Staphylococcus epidermidis* Agr groups I, II, and III. *J. Microbiol.* **57**, 143–153

- (2019).
176. Gu, J. *et al.* Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* **61**, 342–348 (2005).
  177. Silva Filho, R. G. *et al.* Biofilm production by clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with genotypic profile, presence of virulence-related genes and antibiotic resistance. *African J. Microbiol. Res.* **9**, 1026–1036 (2015).
  178. Post V, Harris LG, Morgenstern M, Mageiros L, Hitchings MD, Méric G, Pascoe B, Sheppard SK, Richards RG, M. T. Comparative Genomics Study of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Orthopedic-Device-Related Infections. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 3089–3103 (2017).





# 9. Anexos



## ANEXO I. Consentimiento informado y cuestionario para los participantes del grupo de personas sanas.

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Patogénesis de *Staphylococcus epidermidis* en cepas aisladas de pacientes con infección de prótesis articular

**PROMOTOR:** Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau – IIB Sant Pau

**INVESTIGADORES PRINCIPALES:**

**Hospital de la Santa Creu i Sant Pau:** Alba Sánchez Morillo. Unidad de Microbiología. Tel. 652042520. E-mail: [asanchezmor@santpau.cat](mailto:asanchezmor@santpau.cat)

#### **INTRODUCCION**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento.

#### **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO**

En la primera fase de esta investigación, se ha estudiado la sensibilidad antibiótica, epidemiología, factores de virulencia y formación de biofilm de cepas causantes de infección de prótesis articular de varios pacientes. El objetivo de esta segunda parte del estudio es comparar las cepas patógenas con cepas de *Staphylococcus epidermidis* comensales. Para ello, se pretenden recoger 50 muestras nasales y de la piel de pacientes sanos para realizar la comparación entre las dos poblaciones de cepas.

#### **BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

No se espera que obtenga ningún beneficio para usted por la participación en ese estudio; sin embargo, los resultados de este estudio pueden ayudarnos a evaluar las diferencias entre cepas de *S. epidermidis* causantes de infección de prótesis articular y cepas comensales de portadores sanos.

Tampoco se espera que su participación en este estudio comporte riesgos asociados distintos de los habituales.

#### **CONFIDENCIALIDAD**

La comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

### **COMPENSACIÓN ECONÓMICA**

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto, ni compensación económica.

### **OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE**

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Si tiene alguna duda o desea mayor información puede contactar con el investigador principal de su centro.

Muchas gracias por su colaboración.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Patogénesis de *Staphylococcus epidermidis* en cepas aisladas de pacientes con infección de prótesis articular

Yo.....(nombre y apellidos del testigo) declaro bajo mi responsabilidad que .....(nombre y apellidos del participante) Ha leído (ó se le ha leído, en el caso en que el paciente no pueda leer), la hoja de información que se le ha entregado.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado con:

.....  
(nombre del investigador)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

- Ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio en este estudio y da para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

.....  
**Firma del participante**

**Fecha:**

.....  
**Firma del investigador**

**Fecha:**

De conformidad con lo dispuesto en el art. 5.1 LO 15/1999, de 13 de diciembre, la Fundació de Gestió Sanitaria de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en cotitularidad con el Institut de Recerca pone en su conocimiento que dispone de un fichero con datos de carácter personal denominado "Investigació i Recerca".

La finalidad de su creación es la realización de estudios de investigación y ensayos clínicos. Los destinatarios de la información son todos los profesionales intervinientes en los estudios de investigación y ensayos clínicos del hospital.

En cualquier caso, puede ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición mediante comunicación escrita, adjuntando una fotocopia del DNI del participante, a la dirección del responsable del fichero: c/Sant Antoni Maria Claret, 167. 08025 Barcelona, indicando como referencia "ensayo clínico".

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el participante

### CUESTIONARIO

1. ¿Está tomando algún antibiótico en este momento? Si  No

En caso afirmativo, indique el nombre \_\_\_\_\_

En caso afirmativo, indique la razón \_\_\_\_\_

2. ¿Tomó algún antibiótico en el último mes? Si  No

En caso afirmativo, indique el nombre \_\_\_\_\_

En caso afirmativo, indique la razón \_\_\_\_\_

3. ¿Ha asistido a algún servicio de urgencias de un hospital en los últimos 3 meses?

Si  No

En caso afirmativo, indique el nombre del hospital \_\_\_\_\_

4. ¿Ha estado recientemente internado en un hospital? Si  No

En caso afirmativo, indique el nombre del hospital \_\_\_\_\_

En caso afirmativo, indique la razón \_\_\_\_\_

5. ¿Ha estado de viaje en el último mes? Si  No

En caso afirmativo, indique el lugar \_\_\_\_\_

6. ¿Fuma? Si  No

7. ¿Tiene algún problema en la piel? Si  No

En caso afirmativo, indique cual \_\_\_\_\_

8. ¿En su residencia, está normalmente en contacto con animales?

Si  No

En caso afirmativo, indique cual/cuales \_\_\_\_\_

Por favor, complete la siguiente información:

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Género: Femenino  Masculino

Lugar residencial: \_\_\_\_\_

No escriba aquí:

CÓDIGO MUESTRA: \_\_\_\_\_ Fecha de recolección: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

## ANEXO II. DÍCTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA



Sant Antoni Ma Claret, 167 · 08025 Barcelona  
Tel. 93 291 90 00 · Fax 93 291 94 27  
e-mail: santpau@santpau.cat  
www.santpau.cat

### DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

**Doña Milagros Alonso Martínez**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona,

#### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor, para que se realice el estudio:

TÍTULO: Patogénesis de Staphylococcus epidermidis en cepas aisladas de pacientes con infección de prótesis articular			
PROMOTOR: INSTITUT DE RECERCA HSCSP			
CÓDIGO	Nº EudraCT	VERSIÓN	Ref. HSCSP
IIBSP-STA-2016-81	NO PROCEDE	v. 1 de fecha 04/10/2016	16/254 (OTROS)

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- La capacidad de los investigadores y las instalaciones y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en el **Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona)** por el investigador principal F. Navarro.

Lo que firmo en Barcelona, a 30 de noviembre de 2016

  
FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DE  
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU  
COMITÉ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA  
Dra. Milagros Alonso Martínez

**ANEXO III.** Perfiles de sensibilidad antimicrobiana en todas las cepas de *S. epidermidis*.

Cepa	PEN	VAN	TEI	ERY	TIG	CLI	TET	OXA	CIP	FUS	DAP	COT	GEN	LIN	RIF
HS01	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green
HS02	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Red
HS03	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Red
HS04	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
HS05	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
HS06	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green
HS07	Red	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
HS08	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
HS09	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
HS12	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Yellow
HS15	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Red
HS16	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green
HS17	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Yellow
HS18	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
HS20	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
HS21	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Yellow	Green	Green
HS22	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green
HS23	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green
HS24	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green
HS25	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
HS26	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green
HS27	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
HS28	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
HS29	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green
HS31	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red
HS32	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red
HS34	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green
HS35	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green

HS36	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
HS37	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
HS38	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red
HS39	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
HS40	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS41	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS42	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS44	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green
HS45	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
HS46	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Yellow
HS47	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green
HS48	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
HS49	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
HS50	Red	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS51	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS52	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green
HS53	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS54	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS55	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green
HS56	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green
HS57	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red
HS58	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red
PS01 A1	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS01 A2	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green
PS02	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green
PS03	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS04 A1	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS04 A2	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS05	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS06	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS07	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS08 A1	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PS08 A2	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green



PS09 A1														
PS09 A2	■							■						
PS10	■													
PS11														
PS12 A1	■													
PS12 A2														
PS13										■				
PS14	■			■		■						■		
PS15	■			■						■				
PS16	■													
PS17 A1				■		■								
PS17 A2				■										
PS18	■			■						■				
PS21				■		■								
PS22				■		■							■	
PS24 A1	■			■						■				
PS25														
PS26														
PS27	■			■						■				
PS28	■													
PS29 A1	■			■		■	■	■		■				
PS29 A2	■			■			■	■		■				
PS30				■										
PS31	■			■						■				
PS32 A1	■													
PS32 A2	■			■										
PS33 A1	■									■				
PS33 A2	■			■			■	■		■				
PS34	■							■		■				
PS35 A1	■			■		■							■	
PS35 A2	■												■	
PS36 A1				■										
PS37 A1														

PS37 A2					Red		Red						Red			
PS38 A1					Yellow											
PS38 A2	Red				Red				Red		Red					
PS39																
PS40	Red				Red				Red							
PS41	Red				Red				Red							
Q1	Red				Red			Red	Red	Red	Red			Red		
Q2	Red				Red			Red	Red	Red	Red			Red		
Q3					Red		Red									
Q4	Red				Red			Red	Red	Yellow						
Q5					Red		Red			Red						
Q6					Red		Yellow			Red						
Q7					Red		Red			Red						
Q8	Red				Red			Red		Red						
Q9					Red											
Q10	Red				Red			Red		Red						
Q11	Red				Red			Red		Red						
Q12	Red															
Q13	Red				Red		Red			Red			Red			
Q14	Red				Red		Yellow		Red			Red				Red
Q15	Red				Red		Yellow		Red	Red						
Q16					Red											
Q17	Red				Red			Red		Red		Red				

En rojo: resistencia, en amarillo: resistencia intermedia, en verde: sensibilidad, en naranja: cepas IPA, en azul: cepas PS, en gris: cepas CQ. PEN: penicilina, VAN: vancomicina, TEI: teicoplanina, ERY: eritromicina, TIG: tigeciclina, CLI: clindamicina, TET: tetraciclina, OXA: oxacilina, CIP: ciprofloxacino, FUS: ácido fusídico, DAP: daptomicina, COT: cotrimoxazol, GEN: gentamicina, LIN: linezolid, RIF: rifampicina.

**ANEXO IV. Multilocus Sequence Typing (MLST) de todas las cepas *S. epidermidis*.**

Cepa	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyrR</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>	ST
HS01	28	1	5	5	11	4	4	789
HS02	7	1	2	1	3	3	1	23
HS03	7	1	2	1	3	3	1	23
HS04	7	1	2	2	4	1	1	2
HS05	1	1	2	1	1	1	15	657
HS06	1	5	2	6	2	1	17	658
HS07	7	1	2	2	4	1	1	2
HS08	1	1	6	2	2	1	3	699
HS09	7	1	2	2	4	1	1	2
HS12	2	1	2	2	4	1	1	35
HS15	7	1	2	2	4	1	1	2
HS16	7	1	2	2	4	1	1	2
HS17	28	3	13	5	8	9	11	640
HS18	7	1	2	2	4	1	1	2
HS20	7	1	2	2	2	1	1	280
HS21	1	1	1	1	3	1	1	10
HS22	7	1	53	2	4	1	1	659
HS23	28	3	13	5	8	9	11	640
HS24	7	1	1	2	2	1	1	87
HS25	28	3	13	5	8	9	11	640
HS26	1	1	1	2	2	1	1	5
HS27	7	1	2	2	4	1	1	2
HS28	7	1	2	2	4	1	1	2
HS29	1	1	1	2	2	1	1	5
HS31	7	1	2	2	4	1	1	2
HS32	7	1	2	2	4	1	1	2
HS34	28	3	13	5	8	9	11	640

HS35	1	1	1	2	2	1	1	5
HS36	7	1	2	2	4	1	1	2
HS37	7	1	2	2	4	1	1	2
HS38	7	1	2	2	4	1	1	2
HS39	28	3	13	5	8	9	11	640
HS40	7	1	2	2	4	1	1	2
HS41	7	1	2	2	4	1	1	2
HS42	7	1	2	2	4	1	1	2
HS44	1	1	1	2	2	1	1	5
HS45	28	3	13	5	8	9	11	640
HS46	8	69	17	4	9	6	36	798
HS47	7	1	2	2	4	1	1	2
HS48	25	19	17	4	9	10	2	171
HS49	7	1	2	2	4	1	1	2
HS50	1	1	1	1	2	1	1	57
HS51	7	1	2	2	4	1	1	2
HS52	7	1	1	2	2	1	1	87
HS53	1	1	1	2	2	1	1	5
HS54	7	1	2	2	4	1	1	2
HS55	1	1	1	2	2	1	1	5
HS56	7	1	2	2	4	1	1	2
HS57	7	1	2	2	4	1	1	2
HS58	7	1	1	2	2	1	1	87
PS01 A1	1	1	7	1	3	5	14	32
PS01 A2	2	1	2	2	4	1	1	35
PS02	2	1	1	1	2	1	1	59
PS03	1	1	2	1	2	1	1	89
PS04 A1	1	5	2	6	2	1	6	73
PS04 A2	1	1	2	2	2	1	14	707
PS05	1	1	7	6	2	1	33	387
PS06	1	1	2	1	2	1	1	89
PS07	1	63	7	6	2	1	33	722
PS08 A1	1	1	2	2	3	1	3	200

PS08 A2	49	1	15	5	11	51	4	742
PS09 A1	1	1	2	6	2	16	1	218
PS09 A2	1	1	1	2	2	1	1	5
PS10	1	1	2	1	1	1	1	14
PS11	1	1	2	2	3	52	3	746
PS12 A1	1	1	1	1	1	1	14	278
PS12 A2	1	1	7	2	2	1	29	528
PS13	2	1	6	2	2	1	1	153
PS14	2	1	1	1	2	1	1	59
PS15	2	1	6	2	2	1	1	153
PS16	1	1	2	1	2	1	1	89
PS17 A1	1	1	2	1	2	1	1	89
PS17 A2	1	1	6	2	2	1	1	17
PS18	1	1	2	1	2	1	7	88
PS21	12	1	68	5	6	34	8	747
PS22	1	1	2	1	1	1	15	657
PS24 A1	1	1	7	1	3	5	14	32
PS25	12	1	9	8	7	5	27	790
PS26	1	1	9	5	6	1	8	708
PS27	1	1	69	1	1	1	14	748
PS28	2	1	6	2	2	1	1	153
PS29 A1	1	1	1	1	2	1	1	57
PS29 A2	2	1	2	2	4	1	1	35
PS30	1	1	2	2	1	1	1	85
PS31	1	2	2	46	2	1	3	749
PS32 A1	1	1	2	2	3	1	3	200
PS32 A2	1	1	1	1	1	1	14	278
PS33 A1	1	1	7	1	3	5	14	32
PS33 A2	2	1	2	2	4	1	1	35
PS34	1	1	2	2	1	1	1	85
PS35 A1	2	1	1	2	2	1	1	291
PS35 A2	1	2	1	1	1	1	10	576
PS36 A1	1	1	1	2	2	1	1	5

PS37 A1	1	1	9	5	2	1	1	284
PS37 A2	2	1	1	1	2	1	1	59
PS38 A1	1	1	2	2	2	1	10	794
PS38 A2	12	1	5	5	3	4	11	795
PS39	1	1	9	5	2	1	1	284
PS40	1	53	2	1	2	1	66	837
PS41	1	1	7	1	3	5	14	32
Q1	2	1	2	2	4	1	1	35
Q2	1	1	7	1	3	5	14	32
Q3	1	2	2	2	2	1	3	297
Q4	1	1	6	2	2	1	1	17
Q5	1	1	2	1	2	1	7	88
Q6	1	1	2	1	2	1	1	89
Q7	1	67	2	1	2	1	7	799
Q8	3	1	5	5	7	5	4	796
Q9	1	68	7	6	2	1	33	800
Q10	12	1	5	5	3	4	11	795
Q11	1	1	2	1	1	1	15	657
Q12	1	1	1	2	5	1	1	190
Q13	8	7	12	4	12	2	2	19
Q14	1	1	2	2	2	1	3	166
Q15	1	1	2	1	2	62	1	909
Q16	1	2	2	2	2	1	3	297
Q17	3	1	5	5	7	4	4	898

Números en azul: Nuevo alelo o nuevo secuenciotipo, en naranja: cepas IPA, en azul: cepas PS, en gris: cepas CQ.

**ANEXO V.** Formación de *biofilm* y presencia de determinantes relacionados con la formación de *biofilm* y elementos móviles.

Factores de virulencia																								
Cepa	Biofilm	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>icaR</i>	<i>bhp</i>	<i>agr</i>	<i>atlE</i>	<i>IS256</i>	<i>sdrG</i>	<i>aap</i>	<i>sdrF</i>	<i>luxS</i>	<i>sesI</i>	<i>embp</i>	<i>hld</i>	<i>arc</i>	<i>opp3</i>	<i>kdp</i>	ACME	tipo ACME	tipo agr	
HS01																						2	2	
HS02																							2	1
HS03																							2	1
HS04																							4	1
HS05																							4	1
HS06																							6	1
HS07																							4	1
HS08																							0	3
HS09																							4	1
HS12																							1	1
HS15																							2	1
HS16																							2	1
HS17																							4	4
HS18																							4	1
HS20																							6	1
HS21																							4	1
HS22																							0	1
HS23																							6	4
HS24																							6	2
HS25																							0	4
HS26																							4	2
HS27																							6	1
HS28																							2	1
HS29																							5	2
HS31																							6	1
HS32																							0	1
HS34																							0	4



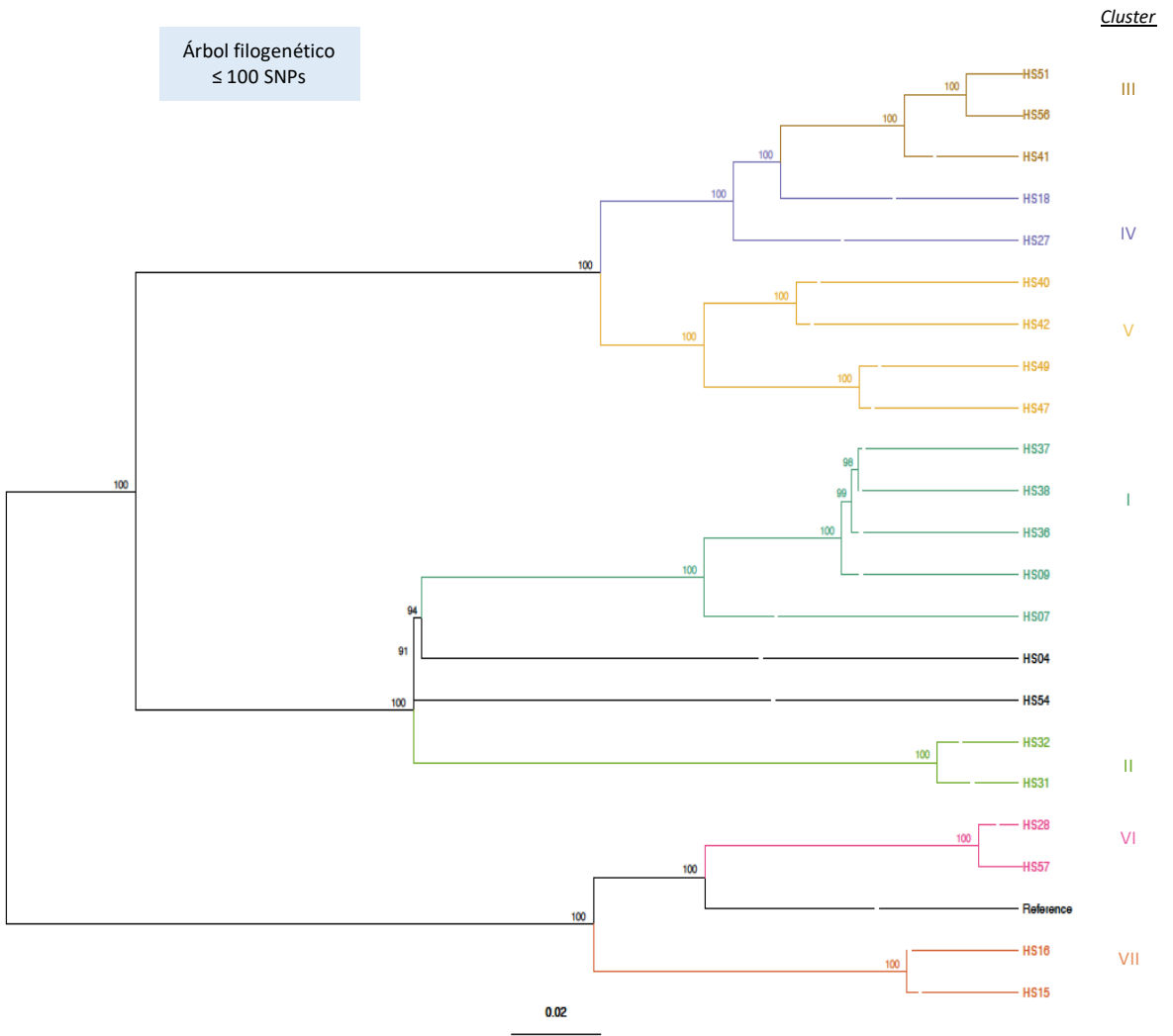




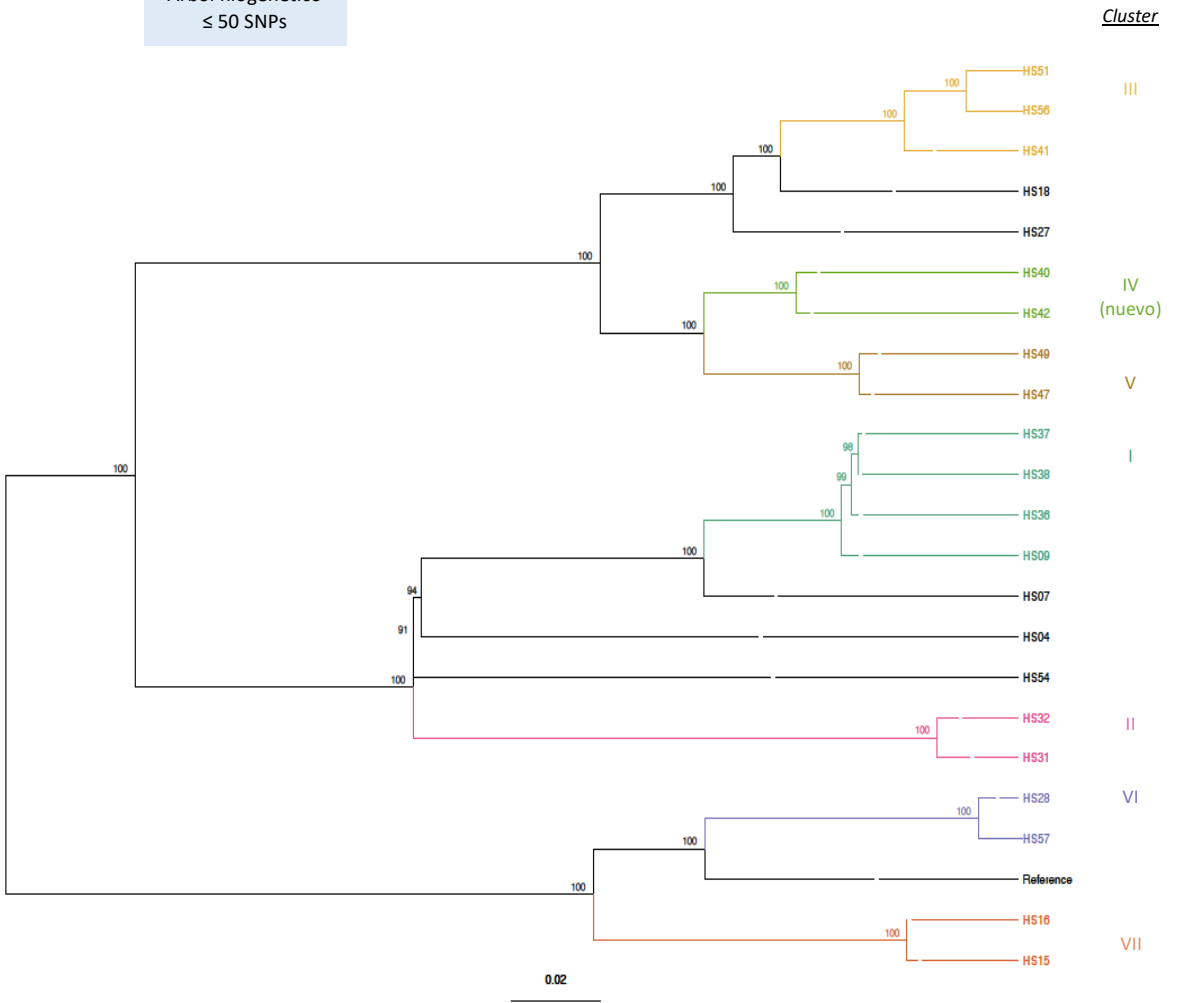


**ANEXO VI.** Árboles filogenéticos de 22 cepas de *S. epidermidis* ST2 del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau reconstruidos mediante una aproximación del algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*-ML) con datos del análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Los árboles fueron generados por RaxML incorporados en Gubbins, basados en la alineación del genoma central con la eliminación de las regiones recombinantes. La barra de escala representa distancias genéticas basadas en sustituciones de nucleótidos por SNP. Los valores indicados sobre los nodos corresponden al valor *bootstrapping* (1.000 repeticiones). Reference: genoma de referencia *S. epidermidis* BPH0662. En color: *clusters* generados en un umbral de  $\leq 100, 50, 25, 20, 17, 15, 12, 10, 5$  y 2 SNPs.

Árbol filogenético  
≤ 100 SNPs

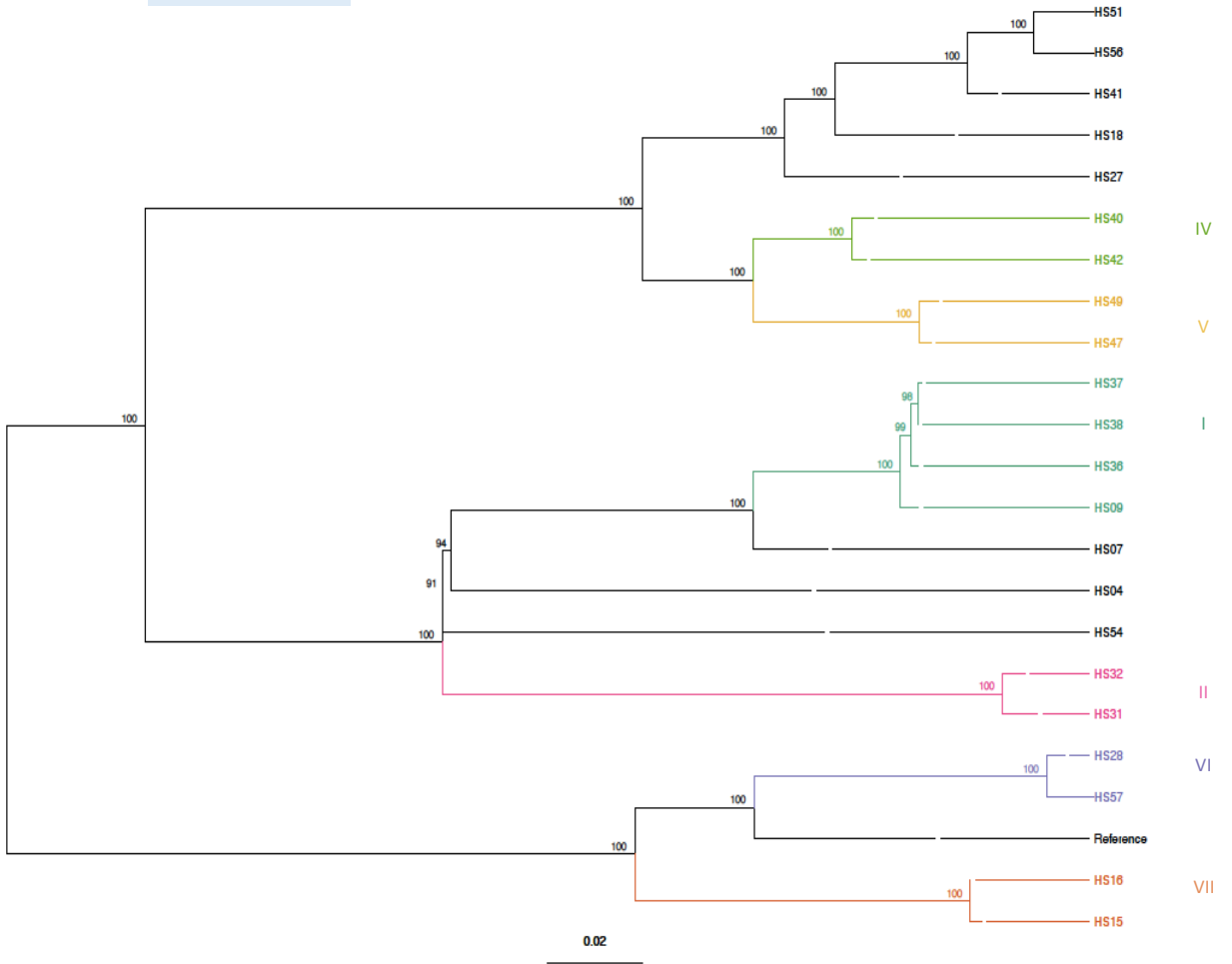


Árbol filogenético  
≤ 50 SNPs

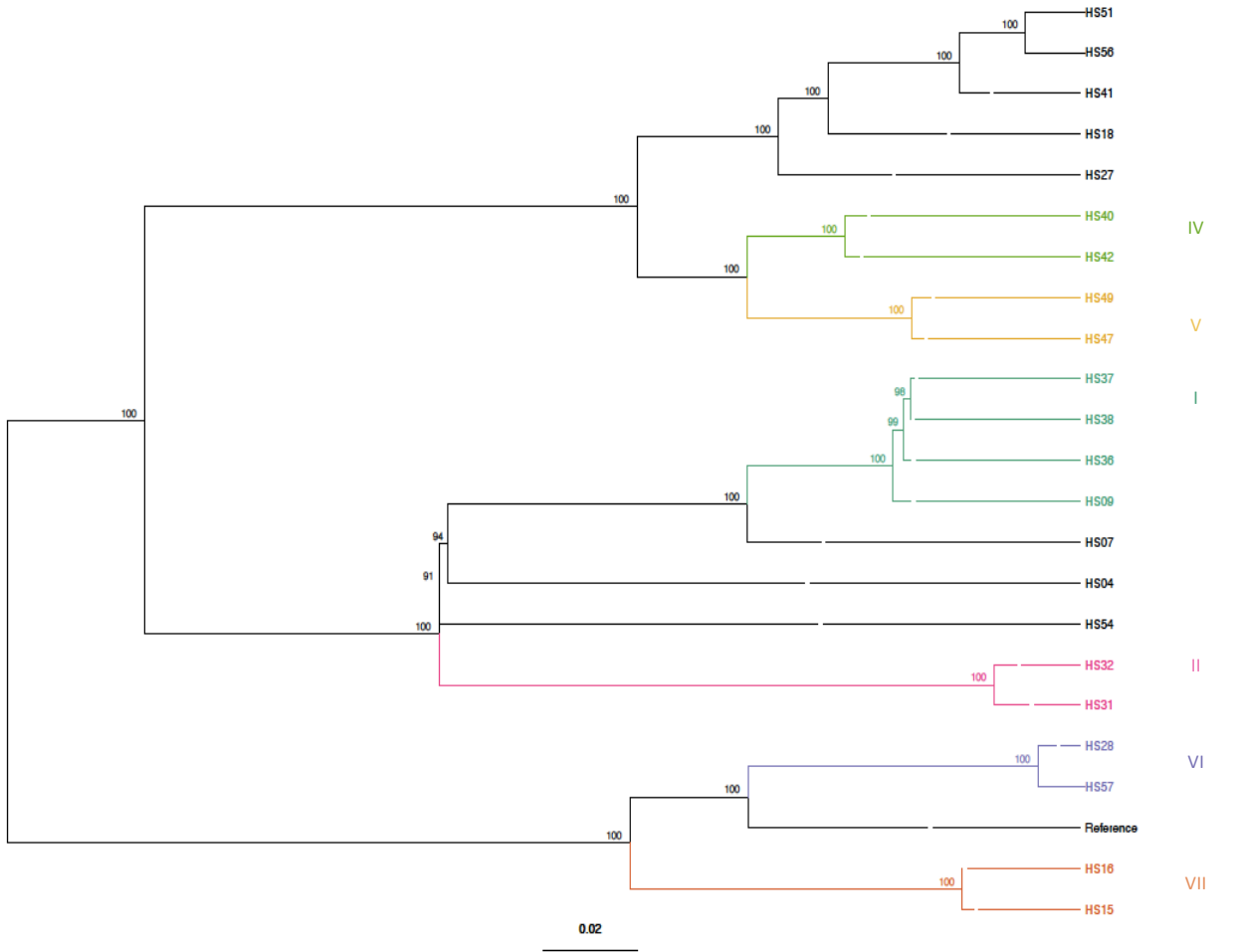


Árbol filogenético  
≤ 25 SNPs

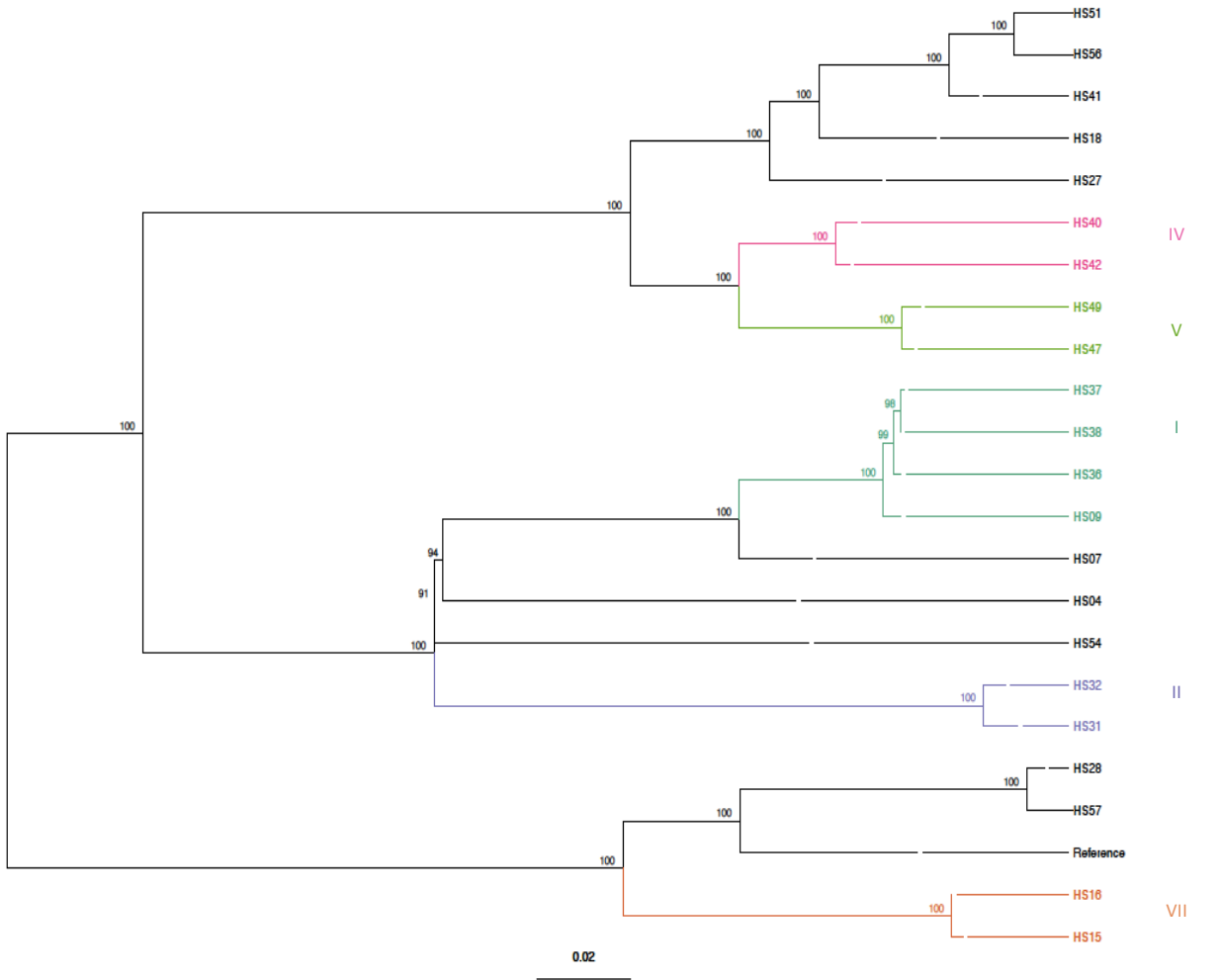
*Cluster*



Árbol filogenético  
≤ 20 SNPs



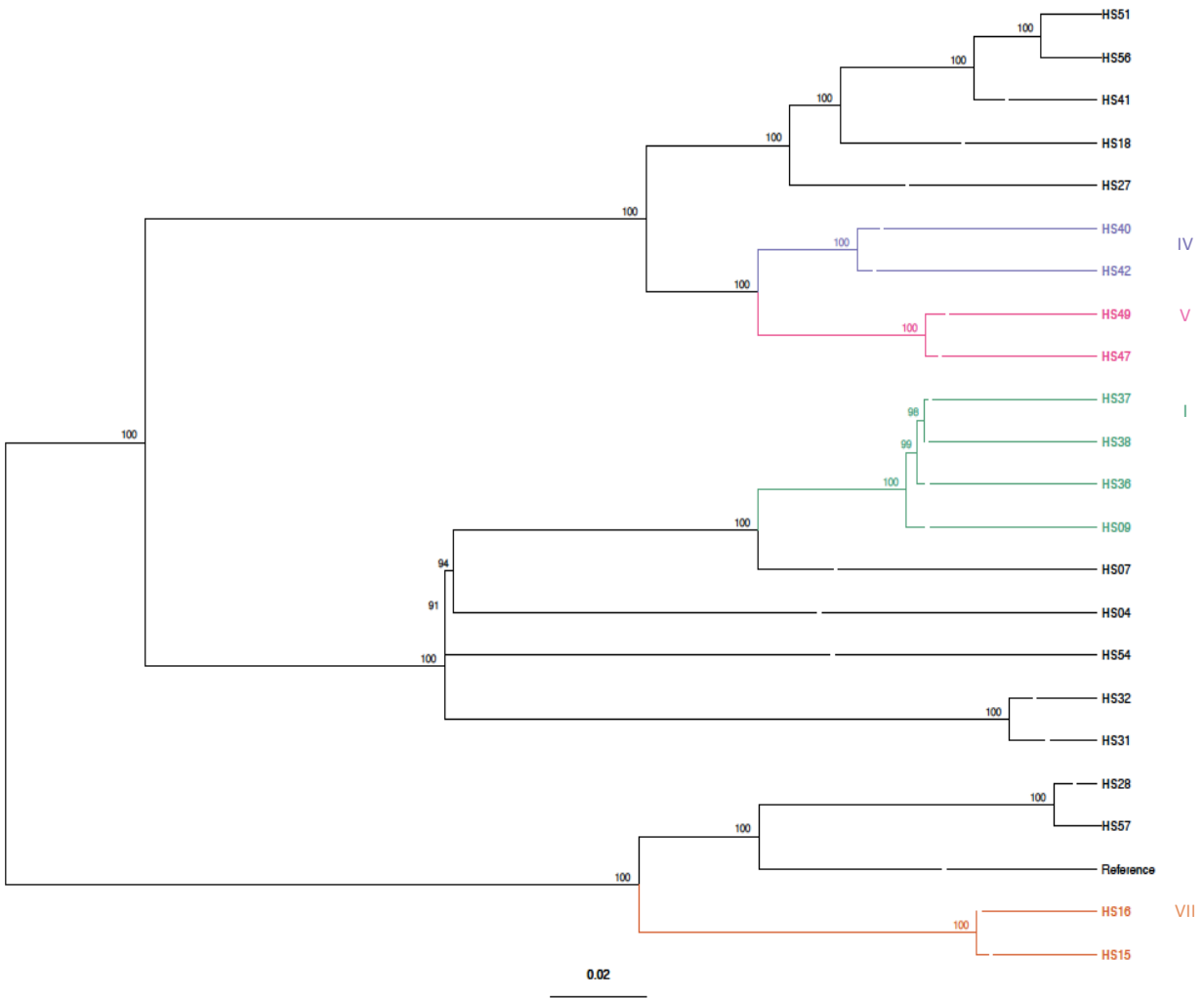
Árbol filogenético  
≤ 17 SNPs



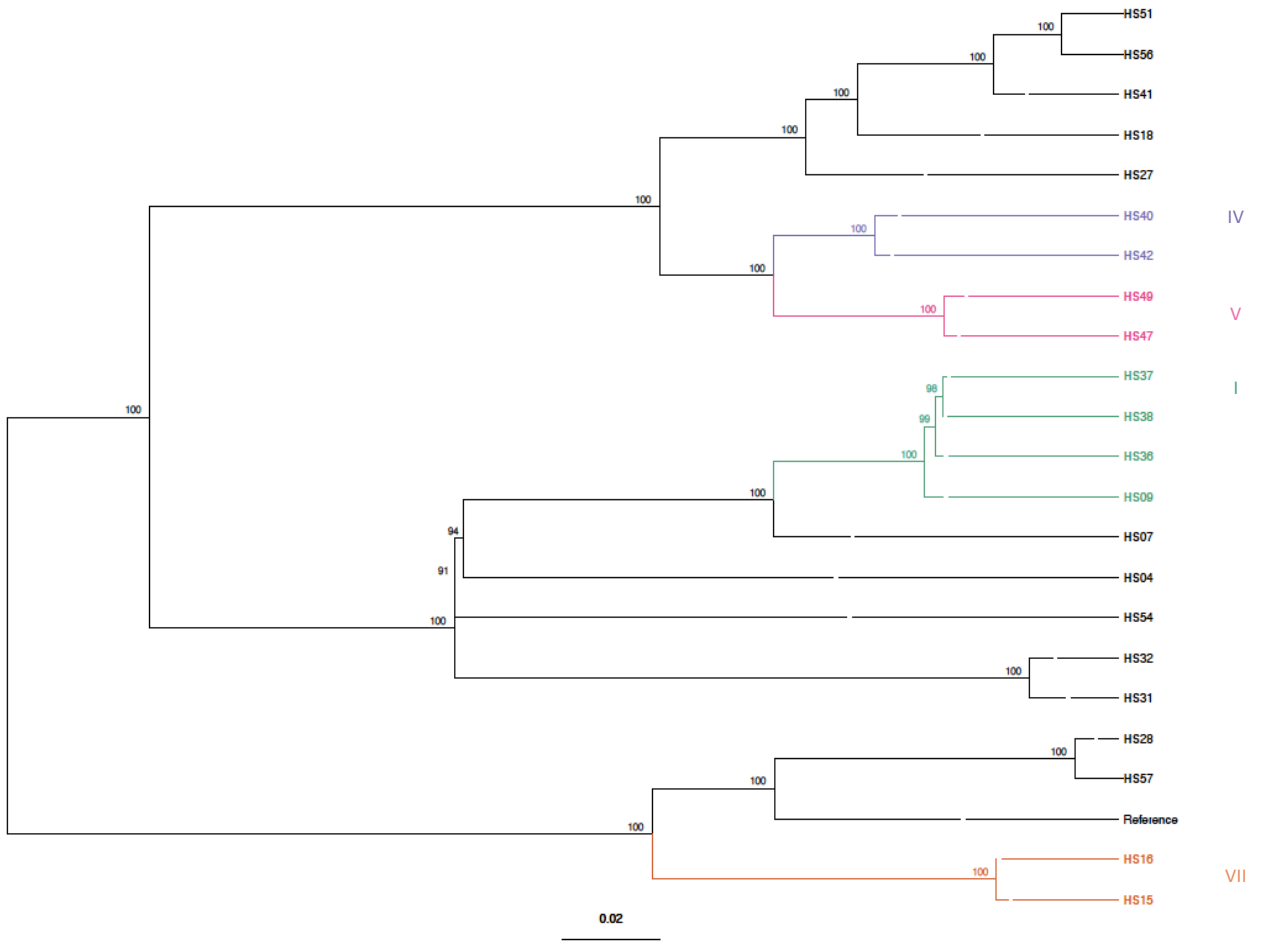


Árbol filogenético  
≤ 15 SNPs

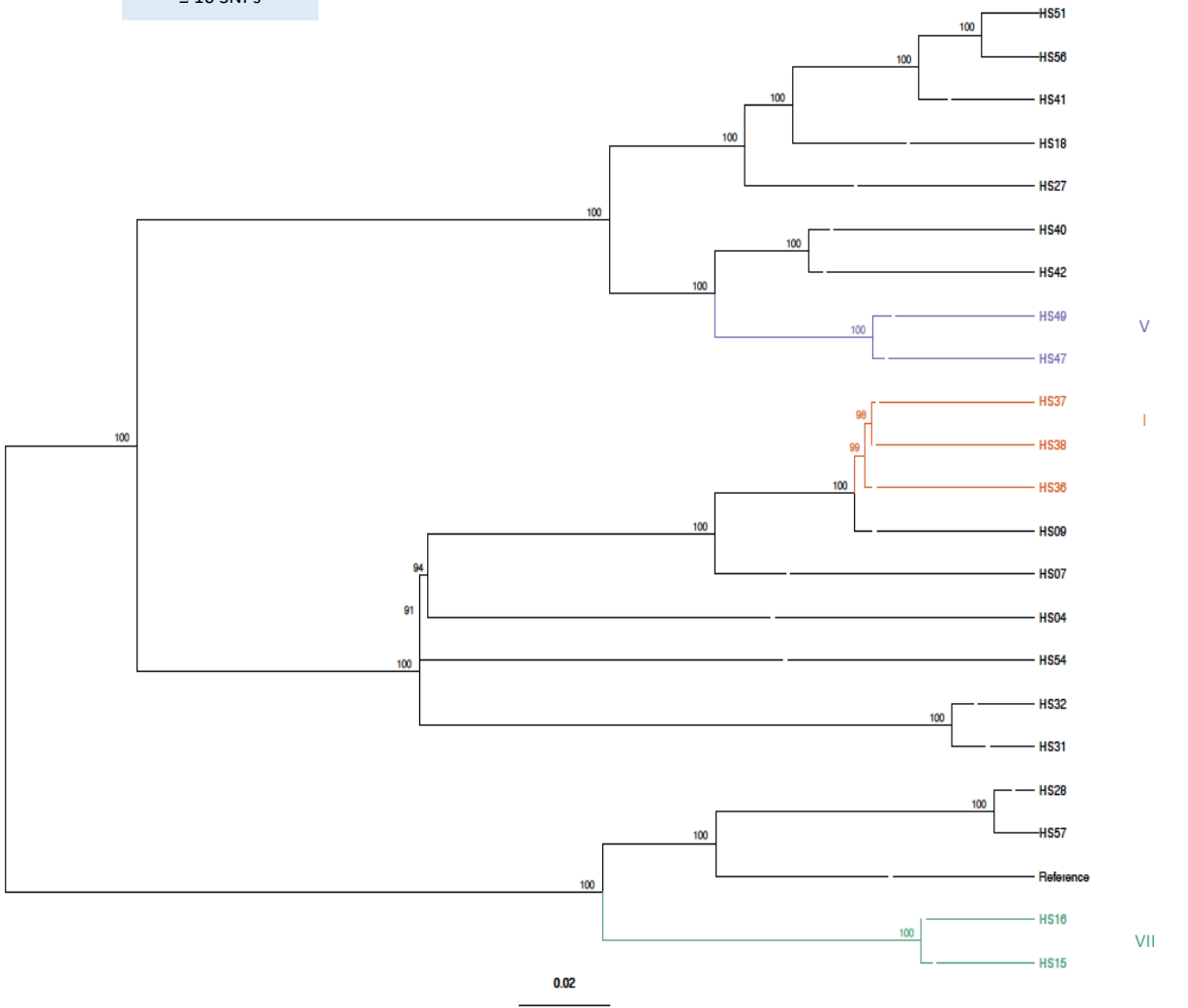
*Cluster*



Árbol filogenético  
≤ 12 SNPs

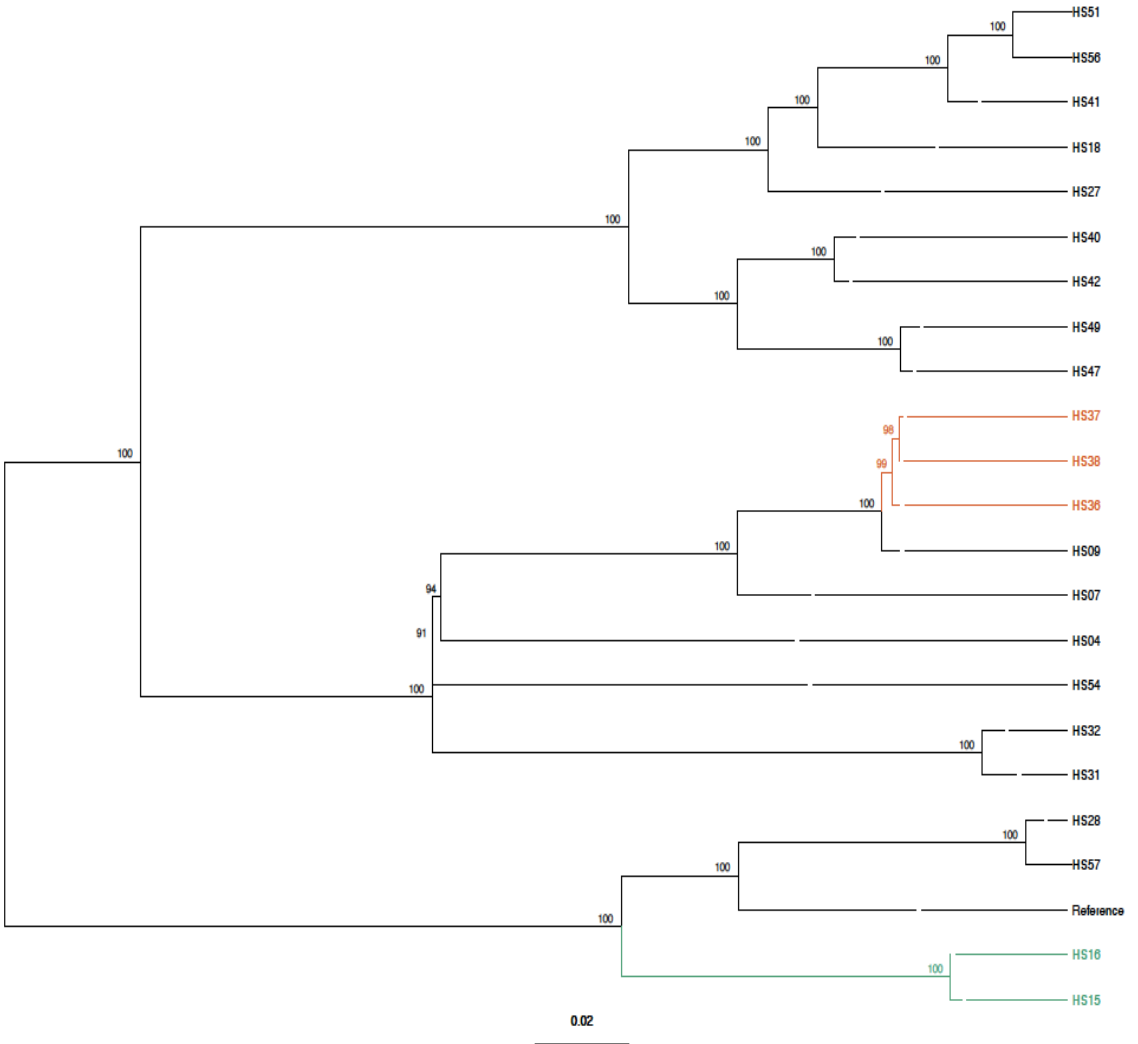


Árbol filogenético  
≤ 10 SNPs



Árbol filogenético  
≤ 5 SNPs

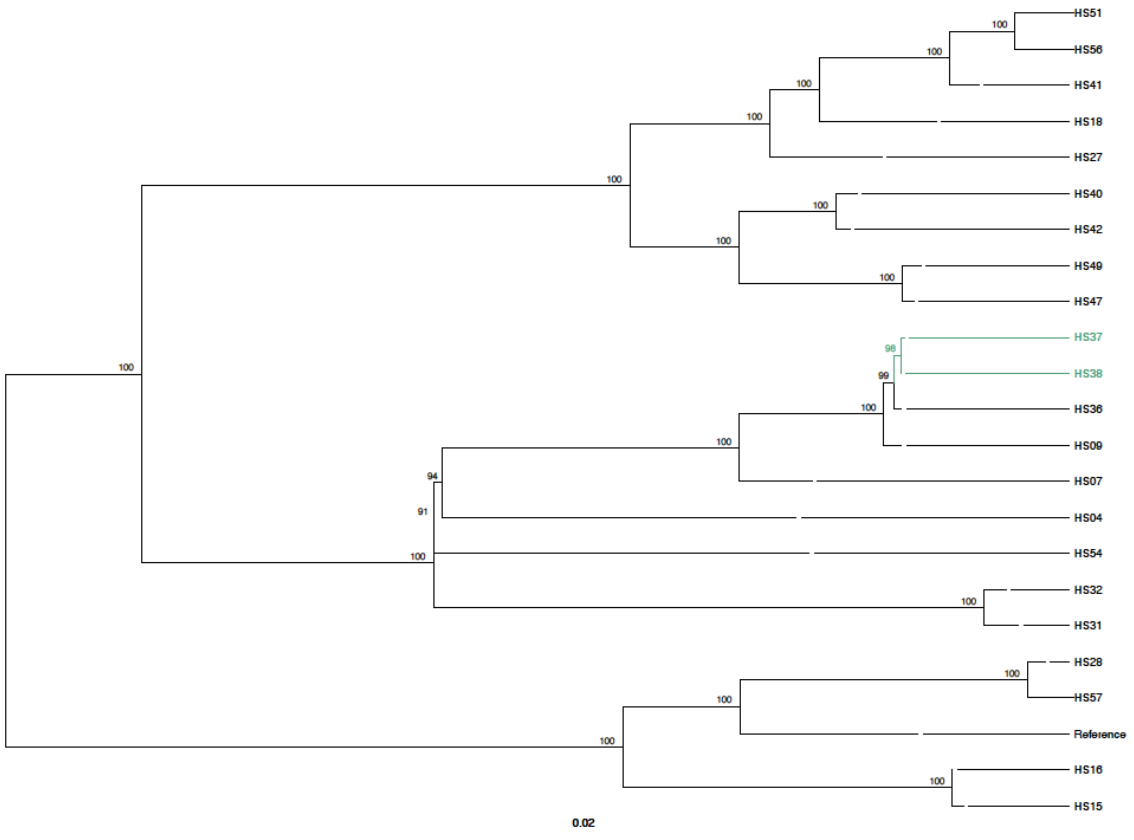
*Cluster*



VII

Árbol filogenético  
≤ 2 SNPs

Cluster



**ANEXO VII. Genes más frecuentes en las cepas ST2 de nuestro estudio y del estudio de Méric *et al.* Datos obtenidos en Scoary.**

Gen	Anotación	Number_pos_present_in (1)	Number_neg_present_in (2)	Number_pos_not_present_in (3)	Number_neg_not_present_in (4)	Sensibilidad	Especificidad
group_3196	Antibacterial protein 2	75	96	3	89	96,15384615	48,10810811
yeiR	hypothetical protein	75	100	3	85	96,15384615	45,94594595
group_2597--group_5587	hypothetical protein--hypothetical protein	75	107	3	78	96,15384615	42,16216216
group_1559	hypothetical protein	75	116	3	69	96,15384615	37,2972973
group_303	putative lipoprotein	76	121	2	64	97,43589744	34,59459459
apbE	FAD:protein FMN transferase	76	122	2	63	97,43589744	34,05405405
catE	Catechol-2,3-dioxygenase	78	140	0	45	100	24,32432432
fbp--yjdJ	Fructose-1,6-bisphosphatase class 3--putative protein YjdJ	77	134	1	51	98,71794872	27,56756757
group_2526	hypothetical protein	76	129	2	56	97,43589744	30,27027027
group_1929	hypothetical protein	77	136	1	49	98,71794872	26,48648649
nhaP2	K(+)/H(+) antiporter NhaP2	77	136	1	49	98,71794872	26,48648649
aldA_1--aldA_2	Lactaldehyde dehydrogenase--Putative aldehyde dehydrogenase AldA	77	136	1	49	98,71794872	26,48648649
frdA	Fumarate reductase flavoprotein subunit	76	131	2	54	97,43589744	29,18918919
group_210	Putative NAD(P)H nitroreductase	75	127	3	58	96,15384615	31,35135135
group_2431	dITP/XTP pyrophosphatase	75	127	3	58	96,15384615	31,35135135
znuA_1	High-affinity zinc uptake system binding-protein ZnuA	76	132	2	53	97,43589744	28,64864865
murI	Glutamate racemase	75	128	3	57	96,15384615	30,81081081
arcA	Arginine deiminase	77	138	1	47	98,71794872	25,40540541
yfnB--group_3199	Putative HAD-hydrolase YfnB--hypothetical protein	75	129	3	56	96,15384615	30,27027027
group_5655	hypothetical protein	75	132	3	53	96,15384615	28,64864865
menD	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase	75	133	3	52	96,15384615	28,10810811
argO	Arginine exporter protein ArgO	76	138	2	47	97,43589744	25,40540541
group_3570	hypothetical protein	75	134	3	51	96,15384615	27,56756757
menA--pchA	1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase--Salicylate biosynthesis isochorismate synthase	75	135	3	50	96,15384615	27,02702703
tagF_2	hypothetical protein	77	144	1	41	98,71794872	22,16216216
group_230--group_4519	hypothetical protein--hypothetical protein	76	140	2	45	97,43589744	24,32432432
group_19956	hypothetical protein	75	136	3	49	96,15384615	26,48648649
group_2694	hypothetical protein	75	136	3	49	96,15384615	26,48648649
group_5630	hypothetical protein	75	138	3	47	96,15384615	25,40540541
menE_1	2-succinylbenzoate--CoA ligase	77	148	1	37	98,71794872	20
adh_2	Alcohol dehydrogenase	76	144	2	41	97,43589744	22,16216216
xyiB_2	Xylose kinase	76	144	2	41	97,43589744	22,16216216
ppaX	Pyrophosphatase PpaX	78	156	0	29	100	15,67567568
btuD_1	Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD	76	147	2	38	97,43589744	20,54054054
group_1593	hypothetical protein	75	142	3	43	96,15384615	23,24324324

<b>group_3054-- ynfM</b>	hypothetical protein-- inner membrane transport protein YnfM	75	142	3	43	96,15384615	23,24324324
<b>group_1253</b>	putative oxidoreductase	75	144	3	41	96,15384615	22,16216216
<b>group_20176- group_20571</b>	Organic hydroperoxide resistance protein-like protein--hypothetical protein	75	143	3	42	96,15384615	22,7027027
<b>rpsG</b>	30S ribosomal protein S7	78	160	0	25	100	13,51351351
<b>rpsL--rplL-- rplJ--rplGB</b>	30S ribosomal protein S12--50S ribosomal protein L7/L12--50S ribosomal protein L10-- Ribosome-associated protein L7Ae-like protein	78	160	0	25	100	13,51351351
<b>group_3550</b>	hypothetical protein	76	149	2	36	97,43589744	19,45945946
<b>msrAB</b>	Peptide methionine sulfoxide reductase msrA/msrB	75	145	3	40	96,15384615	21,62162162
<b>mutT2</b>	Putative 8-oxo-dGTP diphosphatase 2	75	145	3	40	96,15384615	21,62162162
<b>group_758</b>	hypothetical protein	75	146	3	39	96,15384615	21,08108108
<b>rpoB--fusA</b>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta--Elongation factor G	78	162	0	23	100	12,43243243
<b>tuf--rpoC</b>	Elongation factor Tu-- DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	78	162	0	23	100	12,43243243
<b>group_3258</b>	hypothetical protein	76	152	2	33	97,43589744	17,83783784
<b>group_4732</b>	hypothetical protein	76	152	2	33	97,43589744	17,83783784
<b>group_1924</b>	hypothetical protein	76	153	2	32	97,43589744	17,2972973
<b>rlmG</b>	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase G	78	164	0	21	100	11,35135135
<b>btuD_8</b>	Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD	76	154	2	31	97,43589744	16,75675676
<b>hemB-- hemC-- group_4363</b>	Delta-aminolevulinic acid dehydratase-- Porphobilinogen deaminase-- hypothetical protein	77	160	1	25	98,71794872	13,51351351
<b>lacB</b>	Galactose-6- phosphate isomerase subunit LacB	78	166	0	19	100	10,27027027
<b>group_2086</b>	hypothetical protein	75	151	3	34	96,15384615	18,37837838
<b>hemL1--tag</b>	Glutamate-1- semialdehyde 2,1- aminomutase 1--DNA- 3-methyladenine glycosylase 1	77	161	1	24	98,71794872	12,97297297
<b>comC</b>	Type 4 prepin-like proteins leader peptide-processing enzyme	76	157	2	28	97,43589744	15,13513514
<b>thiN</b>	Thiamine pyrophosphokinase	76	157	2	28	97,43589744	15,13513514
<b>group_2290</b>	hypothetical protein	76	159	2	26	97,43589744	14,05405405
<b>group_4313-- accB</b>	hypothetical protein-- Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	76	158	2	27	97,43589744	14,59459459
<b>cpdB_2</b>	2',3'-cyclic-nucleotide 2'- phosphodiesterase/3'- nucleotidase	76	158	2	27	97,43589744	14,59459459
<b>group_2686</b>	Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD	75	155	3	30	96,15384615	16,21621622
<b>group_2717</b>	hypothetical protein	77	164	1	21	98,71794872	11,35135135
<b>group_434</b>	hypothetical protein	77	164	1	21	98,71794872	11,35135135
<b>group_4317</b>	hypothetical protein	75	156	3	29	96,15384615	15,67567568
<b>group_2688</b>	hypothetical protein	78	170	0	15	100	8,108108108
<b>group_1642</b>	hypothetical protein	76	161	2	24	97,43589744	12,97297297
<b>valS--fpgS</b>	Valine--tRNA ligase-- Folypolylglutamate synthase	76	161	2	24	97,43589744	12,97297297
<b>group_4282</b>	hypothetical protein	76	161	2	24	97,43589744	12,97297297
<b>lacD--lacC_2</b>	Tagatose 1,6- diphosphate aldolase- Tagatose-6- phosphate kinase	78	172	0	13	100	7,027027027

<b>lacE</b>	PTS system lactose-specific EII <sup>CB</sup> component	78	171	0	14	100	7,567567568
<b>cpdA_1</b>	3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA	77	167	1	18	98,71794872	9,72972973
<b>yidK</b>	putative symporter protein YidK	77	168	1	17	98,71794872	9,189189189
<b>yhal</b>	hypothetical protein	76	163	2	22	97,43589744	11,89189189
<b>lrpC</b>	HTH-type transcriptional regulator LrpC	78	173	0	12	100	6,486486486
<b>group_2665</b>	Epimerase family protein	75	185	3	0	96,15384615	0
<b>cymR</b>	HTH-type transcriptional regulator CymR	75	185	3	0	96,15384615	0
<b>group_5648</b>	hypothetical protein	75	185	3	0	96,15384615	0
<b>rsbU</b>	Phosphoserine phosphatase RsbU	75	185	3	0	96,15384615	0
<b>group_1568</b>	hypothetical protein	75	161	3	24	96,15384615	12,97297297
<b>group_424</b>	hypothetical protein	75	160	3	25	96,15384615	13,51351351
<b>pdhD_2</b>	Dihydropolyl dehydrogenase	77	169	1	16	98,71794872	8,648648649
<b>ebpS</b>	hypothetical protein	76	165	2	20	97,43589744	10,81081081
<b>group_1247</b>	hypothetical protein	76	165	2	20	97,43589744	10,81081081
<b>group_2002</b>	hypothetical protein	76	165	2	20	97,43589744	10,81081081
<b>accB_1</b>	hypothetical protein	76	165	2	20	97,43589744	10,81081081
<b>dapB</b>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	78	174	0	11	100	5,945945946
<b>namA</b>	NADPH dehydrogenase	76	166	2	19	97,43589744	10,27027027
<b>comGC</b>	ComG operon protein 3	76	166	2	19	97,43589744	10,27027027
<b>ycnI</b>	hypothetical protein	76	166	2	19	97,43589744	10,27027027
<b>group_1097</b>	hypothetical protein	77	170	1	15	98,71794872	8,108108108
<b>group_1271</b>	hypothetical protein	77	170	1	15	98,71794872	8,108108108
<b>oppB</b>	Oligopeptide transport system permease protein OppB	77	170	1	15	98,71794872	8,108108108
<b>bshA</b>	N-acetyl-alpha-D-glucosaminyl L-malate synthase	77	171	1	14	98,71794872	7,567567568

(1) Número de cepas ST2 positivas para el gen, (2) Número de cepas no ST2 positivas para el gen, (3) Número de cepas ST2 negativas para el gen, (4) Número de cepas no ST2 negativas para el gen.



