



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS A PROTEÍNAS DE
SUPERFICIE DE *Staphylococcus epidermidis* (Ses): A, B, C,
E, G, H, I; EN CEPAS AISLADAS DE DOS DIFERENTES NICHOS
(INFECCIÓN Y PIEL SANA)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:
CECILIA SÁNCHEZ AEDO

DIRECTOR DE TESIS
M. en C. Silvestre Vicente Ortega Peña



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: RAÚL GARZA VELASCO

VOCAL: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SECRETARIO: SILVESTRE VICENTE ORTEGA PEÑA

1er. SUPLENTE: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

2°. SUPLENTE: GABRIELA LÓPEZ HERRERA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA, CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y ATENCIÓN A QUEMADOS (CENIAQ) SÉPTIMO PISO, INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”. CIUDAD DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA

M. en C. Silvestre Vicente Ortega Peña

SUSTENTANTE

Cecilia Sánchez Aedo

ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICE TEMÁTICO.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. JUSTIFICACIÓN.....	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. ANTECEDENTES.....	11
4.1 Biopelícula: Definición y estructura.....	11
4.1.1 Formación de biopelícula.....	13
4.1.2 Mecanismos moleculares e interacciones.....	13
4.2 Patogénesis de las biopelículas.....	20
4.3 Proteínas de superficie ancladas a la pared (CWA).....	22
4.3.1 Características generales.....	22
4.3.2 Clasificación de las proteínas CWA.....	23
4.3.3 Procesamiento, secreción y anclaje.....	26
4.4 Proteínas de superficie de <i>S. epidermidis</i> (Ses).....	27
4.5 Aap (SesF).....	27
4.6 Bhp (SesD).....	28
4.7 SesC.....	29
4.8 SdrF y SdrG (Fbe).....	29
4.9 Proteínas Ses y su potencial como antígenos vacunales.....	30
5. METODOLOGÍA.....	32
5.1 Tipo de estudio.....	32
5.2 Cepas de estudio.....	32
5.3 Identificación de las cepas y susceptibilidad antimicrobiana.....	32
5.4 Formación de biopelícula <i>in vitro</i>	33

5.5 Interpretación de la lectura de las microplacas para caracterización de biopelículas.....	35
5.6 Caracterización genotípica.....	36
5.7 Extracción de ADN.....	36
5.8 Amplificación del gen <i>mecA</i>	37
5.9 Amplificación de los genes <i>ses</i> de <i>S. epidermidis</i> : <i>sdrF</i> , <i>sdrG</i> , <i>sesA</i> , <i>sesB</i> , <i>sesC</i> , <i>sesD</i> (<i>bhp</i>), <i>sesE</i> , <i>sesF</i> (<i>aap</i>), <i>sesG</i> , <i>sesH</i> y <i>sesI</i>	38
6. RESULTADOS	40
6.1 Cepas de estudio.....	40
6.2 Resultados de susceptibilidad antimicrobiana.....	40
6.3 Amplificación del gen <i>mecA</i>	45
6.4 Formación de biopelículas <i>in vitro</i>	46
6.5 Detección de los genes <i>ses</i>	47
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	57
9. PERSPECTIVAS	58
10. REFERENCIAS	59
Anexo. Figura 1	65

ABREVIATURAS

Aap	Proteína asociada a la acumulación de la biopelícula*
Agr	Gen accesorio regulador*
ASC	Agar sangre de carnero
AtIE	Autolisina*
Bhp	Proteína homóloga asociada a la biopelícula*
CWA	Proteínas de superficie ancladas a la pared*
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNsas	Enzimas que hidrolizan el ADN
dNTPs	Desoxinucleótido trifosfato*
DO	Densidad óptica
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular*
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas*
Embp	Proteína de unión a la matriz extracelular*
EPS	Sustancia polimérica extracelular*
Fbe	Proteína de unión a fibrinógeno*
G5-E	Familia de repetidos de G5-E*
GlcNAc	N-acetil- β - D-glucosamina transferasa*
IC	Infección de catéter
INR	Instituto Nacional de Rehabilitación
IPA	Infección de prótesis articular
LPXTG	Secuencia específica de aminoácidos: Leucina-Prolina-cualquier aminoácido-Treonina-Glicina*
MPM	Marcador de peso molecular
MSCRAMMs	Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz*
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica*
NEAT	Familia de motivos NEAT*
Nicho	Función de una especie en un hábitat o comunidad biológica.

NIH	Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos de América*
NP	No productor
ORF	Marco de lectura abierto*
PBP2a	Proteína de unión a la penicilina*
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa*
PD	Productor débil
PF	Productor fuerte
PIA	Polisacárido de adhesión intercelular*
PNAG	poli-N-acetilglucosamina*
PS	Aislados de piel sana
PS*	Aislados de piel sana del personal de salud
PSMs	Modulinas solubles en fenol*
QS	<i>Quorum sensing</i> *
S	Secuencia señal*
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
SCCmec	Cassette cromosómico estafilocócico <i>mec</i> *
SCN	Estafilococo coagulasa negativo*
SCOPE	Vigilancia y control de patógenos de importancia epidemiológica*
Sdr	Repetidos de serina-aspartato*
Sec	Sistema de secreción sec
SEMR	<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilina resistente
Ses	Proteínas de superficie de <i>Staphylococcus epidermidis</i> *
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SS	Señal de distribución*
TSB-G	Caldo soya tripticasa adicionado con glucosa*
USA	Estados Unidos de América*
UV	Radiación ultravioleta*
W	Región de anclaje a la pared bacteriana*

*Por sus siglas en inglés

RESUMEN

Staphylococcus epidermidis es un comensal habitual de la piel y membranas en el ser humano, si bien actualmente es considerado un patógeno asociado a infecciones nosocomiales y dispositivos médicos implantados, debido a su capacidad para formar biopelículas, generalmente en prácticas invasivas como las cirugías o la colocación de algún biomaterial.

Las biopelículas corresponden a comunidades de microorganismos que crecen inmersos en una matriz polimérica extracelular, la cual les permite adherirse a superficies inertes o tejido vivo, protegiendo a los integrantes de la acción de los antimicrobianos y de la respuesta inmunológica del hospedero. En la superficie celular de *S. epidermidis*, además de adhesinas de tipo polisacárido (PIA/PNAG), se localiza a un conjunto de proteínas denominadas Ses, cuya principal función consiste en la interacción con las proteínas del hospedador.

Para determinar la presencia de los genes que codifican para algunas adhesinas proteicas de *S. epidermidis*, en esta tesis se analizaron cepas de *S. epidermidis* del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR), provenientes de dos nichos: piel sana (PS) e infección de prótesis articular (IPA), obtenidas durante el periodo del 2011 al 2015. A estas cepas se les realizó PCR punto final para detectar la presencia de los genes *ses*, encontrándose una fuerte presencia del gen *mecA* en aislados de IPA, así como una alta resistencia a diversos antibióticos. Así mismo, observamos una mayor formación de biopelícula *in vitro* en las cepas IPA, comparadas con las cepas PS. También se observó una mayor presencia de los genes *ses* en las cepas PS, y menor presencia de los mismos en las cepas IPA.

De manera interesante, el gen *ses* no se detectó en cepas de PS, por lo que su presencia parece ser exclusiva de los aislados de IPA. Los resultados obtenidos contribuyen a conocer la presencia de los genes *ses* en cepas aisladas de PS e IPA, lo cual podría resultar relevante en la formación de biopelículas por *S. epidermidis* provenientes de pacientes del INR en México.

1. INTRODUCCIÓN

Características de *Staphylococcus*

El nombre *Staphylococcus* proviene de los términos etimológicos *Staphyle* (racimo de uvas) y *kokkos* (grano); fue introducido por Ogston en 1883 para referirse a un grupo de micrococos que causaban inflamación y supuración y, actualmente, el género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, que comprende treinta y seis especies diferentes y siete subespecies. [6, 15, 30]

Los estafilococos son células esféricas Gram positivas con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , que se agrupan en pares, tetradas, cadenas cortas o racimos. Son inmóviles, no esporulados, no capsulados o con una incipiente cápsula, generalmente catalasa positiva porque tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. [43]; la mayoría de las cepas son anaerobias facultativas, con dos excepciones: *S. aureus* spp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus*, que muestran un rápido crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis, además de ser catalasa negativa. [30, 62]

En medios sólidos como el ASC (agar sangre de carnero), después de 18 a 24 horas de incubación, sus colonias son convexas, opacas, lisas, de color blanco-crema a grisáceo y translúcidas, con un diámetro de 1 a 3 mm; además, crecen en condiciones aerobias o de microaerofilia a una temperatura óptima de 37°C. [30]

La especie más representativa de este género es *Staphylococcus aureus*, cuya principal característica es su capacidad de producir la enzima coagulasa, por lo que se considera coagulasa positiva; el resto, son denominadas estafilococos

coagulasa-negativa (SCN) siendo *Staphylococcus epidermidis* su agente más frecuente. [5, 41, 43]

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis es un comensal habitual de la epidermis (piel y membranas en humanos y otros mamíferos) [8]; su localización es mayor en las áreas más húmedas del cuerpo, como: axilas, ombligo, cavidad nasal, conjuntiva, región glútea e inguinal, fosa cubital de brazos y área del poplíteo en rodillas. [5] Cabe señalar que en el 2005 se secuenció el genoma de dos cepas de referencia: la primera cepa fue *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984), que tiene un tamaño de genoma de 2,6 Mb y es productora de biopelícula y, la segunda, es *S. epidermidis* (ATCC 12228) y no produce biopelícula. [21, 38]

En los últimos años, *S. epidermidis* ha cobrado relevancia clínica, por ser un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos (neonatos prematuros, pacientes trasplantados o con cirugías recientes, individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), quemaduras graves, quimioterapia asociada a cáncer, etcétera). [8, 20] Así mismo, sobresale en pacientes en quienes se han implantado dispositivos médicos (prótesis, catéteres, dispositivos cardíacos), dada su capacidad para adherirse y colonizar tejido vivo y superficies inertes, formando biopelículas que originan infecciones difíciles de tratar. [5, 17, 22] De hecho, se ha sugerido que la formación de biopelículas es el factor de virulencia más importante en *S. epidermidis*. [48]

Factores de virulencia

A diferencia de *S. aureus* que posee diversos factores de virulencia, aparentemente *S. epidermidis* tiene un número reducido de ellos, los cuales están relacionados principalmente con la formación de biopelículas (ver **Tabla 1**). También se sabe que este SCN secreta algunas toxinas peptídicas anfipáticas conocidas como modulinas solubles en fenol (PSMs por sus siglas en inglés: Phenol-soluble modulins); un ejemplo son PSM- β , PSM- γ y PSM- δ .^[48] Sin embargo, recientemente se descubrió que ciertas cepas producen un factor denominado PSM-mec, que pertenece a la familia de las PSMs. La PSM-mec deriva del gen *psm-mec* localizado dentro del cassette cromosómico estafilocócico “SCCmec”, que codifica para un péptido citolítico encontrado en cepas meticilina resistentes.^[42] De acuerdo con Yang *et al.*^[63], se ha observado que la adquisición del gen *psm-mec* promovería la formación de la biopelícula en *S. epidermidis*.

La formación de biopelículas en dispositivos médicos implantados, hacen que *S. epidermidis* se convierta en uno de los patógenos invasivos que recientemente ha tomado relevancia clínica, además de *S. aureus*.^[48]

Tabla 1. Factores de virulencia descritos para *S. epidermidis*.

Factor de Virulencia	Gen	Función	Referencia
Toxinas			
PSM-mec (Modulina soluble en fenol)	<i>psm-mecA</i>	Promueve la formación de biopelícula	[42, 63]
PSMs (Modulinas solubles en fenol)	<i>psmα</i> , <i>psmδ</i> , <i>psmϵ</i> , <i>hld</i> , <i>psmβ1</i> y <i>psmβ2</i>	Actividad tensoactiva (Disgregación de biopelícula)	[38]
Formación de la biopelícula a través de la unión primaria a superficies inertes			
AtIE	<i>atIE</i>	Abundante autolisina que afecta la hidrofobicidad de la superficie	[38]
Ácidos teicoicos	Múltiples genes	Favorecen la adhesión a la fibronectina	[40]
Formación de la biopelícula a través de la unión primaria a proteínas de la matriz extracelular			
SdrF	<i>sdrF</i>	Unión a colágena tipo I, y a materiales plásticos (Dacron)	[40]
SdrG (Fbe: Proteína de unión a fibrinógeno)	<i>sdrG/fbe</i>	Unión a fibrinógeno (adherencia a superficies recubiertas con fibrinógeno); adhesión y agregación plaquetaria	[58]
AtIE	<i>atIE</i>	Unión a proteínas de la matriz extracelular, como vitronectina	[38]
Embp (Proteína de unión a la matriz extracelular)	<i>embp</i>	Unión a superficies recubiertas por fibronectina	[58]
Agregación Celular			
Aap (Proteína asociada a la acumulación)	<i>aap</i>	Induce la formación de la biopelícula	[53]
Bhp (Proteína asociada a la biopelícula)	<i>bhp</i>	Promueve la adherencia	[7]
PIA /PNAG (Polisacárido de adhesión intercelular)	<i>icaADBC</i>	Adhesina intercelular necesaria para la formación de la biopelícula	[38]

Tomado de (Otto, M., 2009) y actualizada por nosotros.

Relevancia clínica

Generalmente, la interacción de *S. epidermidis* con la piel es de bajo riesgo, porque no tiene la capacidad de causar infecciones invasivas en personas sanas ^[48]; sin embargo, debido a su abundancia en la piel, se internaliza rápidamente por fisuras en la epidermis, causadas por heridas quirúrgicas, inserción de agujas, catéteres y dispositivos médicos. ^[13, 16] Anteriormente, *S. epidermidis* era considerado contaminante de muestras clínicas y puntas de catéteres intravenosos, sin relevancia clínica. No obstante, es el patógeno más importante asociado a infecciones nosocomiales (bacteriemias, heridas operatorias, catéteres cortos o permanentes) y dispositivos médicos implantados. ^[62] La implantación de dispositivos médicos ha ido en aumento alrededor del mundo e involucra la inserción de un cuerpo extraño como: prótesis articular, ósea o dental, válvulas cardíacas, marcapasos, dispositivos intrauterinos, lentes de contacto, catéteres venosos o de diálisis y dispositivos para fijar fracturas óseas (placas, clavos y tornillos). ^[12, 23] Durante la colocación del dispositivo médico, *S. epidermidis* se internaliza por inoculación directa del dispositivo o por vía hematológica, y causa infecciones crónicas y persistentes, las cuales pueden ser superficiales o profundas. Lógicamente puede provocar el retiro de los dispositivos médicos contaminados y en el peor de los casos, ocasionar el deceso del paciente si no es detectado tempranamente. ^[23] En 2017, Sabaté-Brescó *et al.* ^[48] reportaron que *S. epidermidis* es el responsable de aproximadamente el 20% de todas las infecciones por dispositivo médico ortopédico.

De acuerdo con cifras obtenidas en USA, *S. epidermidis* es el agente etiológico más aislado por hemocultivos y análisis de catéteres; y los reportes de la Vigilancia y Control de Patógenos de Importancia Epidemiológica (SCOPE) indican que esa especie es la más aislada en bacteriemias nosocomiales asociadas a catéteres intravenosos de corta y larga duración. [8]

En la actualidad, la capacidad de *S. epidermidis* para formar biopelículas que causan infecciones difíciles de tratar convencionalmente, ha provocado altas tasas de morbilidad y mortalidad y costos elevados para los pacientes y los sistemas de salud. [12] Sumado a ello, en la mayoría de los aislados de *S. epidermidis*, se ha detectado resistencia a la meticilina. [48]

***Staphylococcus epidermidis* Meticilina Resistente (SEMR)**

A finales de los años sesentas, el uso continuo de penicilinas y penicilinas semi-sintéticas como meticilina y oxacilina originó la aparición de estafilococos meticilina resistentes: *S. aureus* (SAMR) y *S. epidermidis* (SEMR). [21] La resistencia a meticilina ocurre por la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica para la proteína PBP2a (por sus siglas en inglés: Penicilline-binding protein 2a), que tiene baja afinidad por los antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos). El gen *mecA* en *S. epidermidis* le confiere resistencia hacia esta familia de antibióticos [16, 54], no es endógeno y se encuentra ampliamente distribuido, tanto en *S. aureus* como en otras especies de SCN; forma parte de un elemento genético móvil, denominado cassette cromosómico estafilocócico *mec*

(SCCmec, por sus siglas en inglés: Staphylococcal cassette chromosome mec), que se inserta en el cromosoma de *S. epidermidis*, particularmente, en un sitio específico próximo al origen de replicación. [26] Del origen y evolución del gen *mecA* poco se sabe, salvo que proviene de múltiples eventos de transferencia horizontal [1, 47]; además, estudios *in vivo* han demostrado la transferencia del gen *mecA* de cepas de *S. epidermidis* a cepas de *S. aureus*. [61] La transmisión nosocomial de cepas SERM se realiza fácilmente, por contacto entre los pacientes, a través de las manos contaminadas del personal hospitalario, y al tocar las superficies o el instrumental médico contaminado. Las cepas SERM representan aproximadamente entre 80-90% de los aislados en el ámbito nosocomial, y gran parte contiene el elemento genético móvil “SCCmec”. [5, 17] Es probable que la transición de un *S. epidermidis* comensal a un patógeno invasivo esté relacionada con la continua recombinación génica entre los SCN y la especie *S. aureus*, con la transferencia de factores de virulencia a través de elementos genéticos móviles; que evolutivamente le han conferido resistencia antimicrobiana y virulencia a *S. epidermidis*. [21] Aproximadamente un 80% de la resistencia de SCN a los antimicrobianos proviene de elementos genéticos exógenos. [36]

En buena parte, el aumento a la resistencia de los antibióticos por parte de *S. epidermidis* se debe al uso irracional de los antibióticos (la automedicación) y su éxito como patógeno invasivo se sustenta en la formación de biopelícula (por el término en inglés, biofilm o slime).

2. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus epidermidis es un microorganismo comensal que en los últimos años ha emergido como uno de los patógenos oportunistas más importantes, principalmente en infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos. Hasta ahora sus principales factores de virulencia son la resistencia antimicrobiana y su capacidad para formar biopelículas; estas últimas causan infecciones crónicas y son difíciles de tratar convencionalmente, por lo que generan altas tasas de morbilidad y mortalidad, así como elevados costos económicos a los sistemas de salud.

El incremento de la resistencia antimicrobiana en *S. epidermidis* y la falta de nuevos antibióticos, hace urgente la necesidad de buscar nuevos “blancos terapéuticos” para prevenir o erradicar las infecciones ocasionadas por esta bacteria. Uno de estos “blancos” se ubica en las proteínas de superficie que se anclan a la pared, conocidas como Ses, de las cuales algunas participan en la formación de biopelículas.

Hasta ahora, la detección de genes *ses* se ha llevado a cabo en cepas de laboratorio o de referencia; por ejemplo, en *S. epidermidis* (RP62A); sin embargo, su presencia en cepas de origen clínico o en las aisladas de piel sana ha sido poco estudiada. Por lo tanto, es importante efectuar estudios genotípicos que permitan conocer la frecuencia y distribución de los mismos en cepas aisladas de distinto origen, para que en trabajos posteriores se midan niveles de expresión, principalmente de los genes *ses A, B, C, E, G, H e I*; los cuales han sido poco analizados.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar genes que codifican a proteínas de superficie de *Staphylococcus epidermidis* (Ses): A, B, C, E, G, H, I; en cepas asociadas a dos diferentes nichos: piel sana de fosa cubital del brazo e infección de prótesis articular de cadera y rodilla.

Objetivos específicos

- Resembrar cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de infección de prótesis articular (cadera y rodilla); así como cepas control aisladas de la fosa cubital del brazo de personas sin prótesis (piel sana).
- Realizar a todas las cepas su perfil de susceptibilidad antimicrobiana a distintas familias de antibióticos.
- Identificar las cepas formadoras de biopelículas con base en sus características fenotípicas y moleculares.
- Detectar los genes ses: A, B, C, E, G, H e I, a partir de cepas clínicas y control por PCR punto final.
- Determinar la frecuencia de estos genes detectados por PCR punto final.

4. ANTECEDENTES

4.1 Biopelícula: Definición y estructura

En general, las biopelículas representan un estado habitual del crecimiento bacteriano y de la supervivencia en la naturaleza ^[28]; se definen como una comunidad de microorganismos que crecen inmersos en una matriz extracelular, la cual permite a los integrantes adherirse a superficies inertes o al tejido vivo, simulando ser una torre o un hongo (ver **Figura 1**). ^[5]

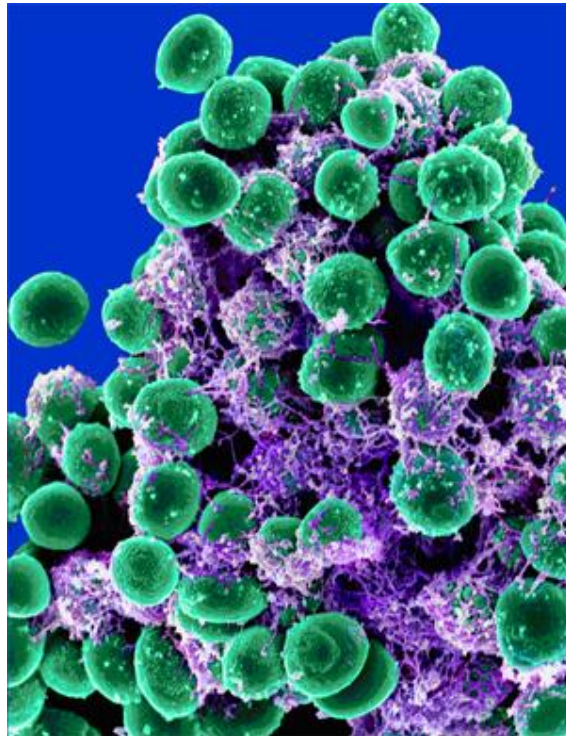


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de la biopelícula de *S. epidermidis*. (<https://www.niaid.nih.gov/research/michael-otto-phd>)

La composición de la biopelícula es variable entre los estafilococos; fundamentalmente se componen de agua (97% del total), células bacterianas y la matriz extracelular, la cual es un complejo formado por sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés: Extracellular Polymeric Substance), que son auto-secretadas por la bacteria, destacando principalmente los polisacáridos, proteínas, lípidos, minerales y ADN extracelular (eDNA, por sus siglas en inglés: extracellular DNA) como resultado de la lisis bacteriana. [5]

La matriz extracelular proporciona el soporte y la estructura a la biopelícula, su arquitectura consiste en una compleja red de canales, las cuales permiten la comunicación entre las células y el flujo de los nutrientes, agua y difusión de oxígeno, llegando a las zonas más profundas de la estructura. [12] Además ayuda a proteger a las células frente a situaciones adversas como estrés, deshidratación, cambios de pH, choque osmótico, radiación ultravioleta (UV), metales tóxicos, exposición a ácidos, etcétera. [56]

La matriz extracelular está compuesta en la mayoría de las cepas por el PIA/PNAG (PIA, por sus siglas en inglés: Polysaccharide Intercellular Adhesine). El polisacárido de adhesión intercelular o poli-N-acetilglucosamina PNAG (por sus siglas en inglés poly-N-acetyl-glucosamine), tiene un tamaño de aproximadamente 780 kDa y su función consiste en facilitar la adhesión y agregación entre las bacterias. [44] Para la síntesis del PIA/PNAG son necesarias enzimas codificadas en un operón llamado *icaADBC* que se detallará posteriormente.

El PIA/PNAG es fundamental para la formación de la biopelícula en multicapas y para la virulencia de *S. epidermidis* en las infecciones asociadas a dispositivos

médicos; de hecho, es el componente más estudiado en las biopelículas estafilocócicas. [40, 44] Sin embargo existen cepas que no forman biopelícula mediante PIA/PNAG (PIA negativas), sino por un mecanismo alternativo llamado PIA/PNAG independiente, utilizando adhesinas intercelulares de carácter proteico. [12] La capacidad de fijación y formación de la biopelícula depende de factores tales como la superficie de unión, la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH y la presencia de otras bacterias. [56]

4.1.1 Formación de la biopelícula

4.1.2 Mecanismos moleculares e interacciones

La formación de la biopelícula en *S. epidermidis* es un proceso complejo, dinámico y multifactorial; en general, se han descrito cuatro fases: 1) fijación, 2) agregación celular, 3) maduración y 4) dispersión (ver **Figura 2**). [5] Estas fases no están definidas, se encuentran entremezcladas, y en cada una están implicados mecanismos genéticos y moleculares, que son expresados y regulados de acuerdo con las condiciones del medio. [37]

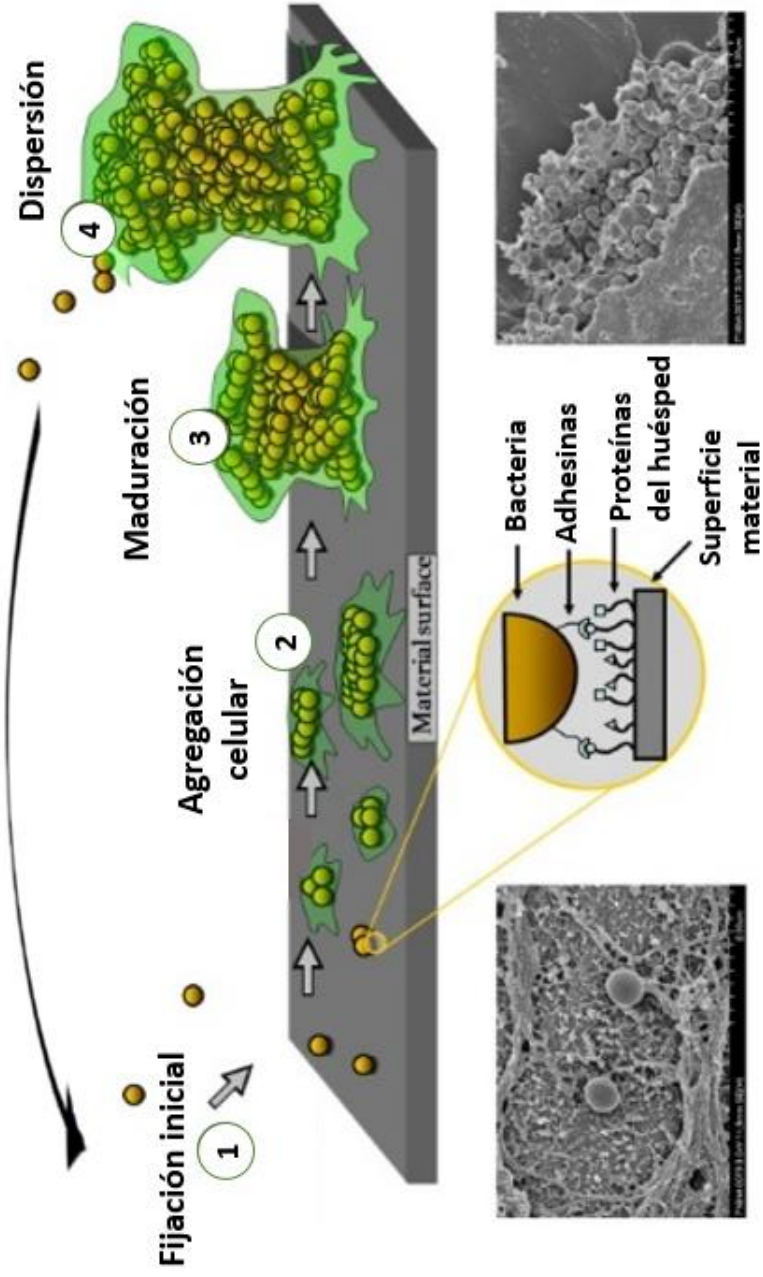


Figura 2. Fases de formación de la biopelícula de *S. epidermidis*. Modificada de Sabaté-Brescó et al., 2017.

Fijación

En la fase inicial del proceso de formación de la biopelícula, las células de *S. epidermidis* se unen a una superficie inerte ^[44], proceso que involucra a dos etapas:

1) Adsorción, se basa en interacciones inespecíficas y reversibles entre la superficie de las células bacterianas y la superficie inerte, destacando las fuerzas fisicoquímicas como las de Van der Waals y las hidrofóbicas, etc ^[5, 37]; y **2)**

Adhesión, ocurre de manera específica e irreversible, entre las células bacterianas y la superficie inerte recubierta con matriz extracelular del hospedero; esto es a través de componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMMs; por sus siglas en inglés: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). ^[5, 12] Cabe señalar que cuando un dispositivo médico es implantado, éste se empieza a recubrir de proteínas plasmáticas y productos de la coagulación del hospedero (trombina y plaquetas), las cuales son reconocidas por proteínas/adhesinas de superficie ancladas covalentemente a la pared celular de *S. epidermidis* (CWA; por sus siglas en inglés: Cell Wall Anchored); ello forma uniones específicas estables ligando-receptor. ^[5, 8, 48] Se han descrito diversos MSCRAMMs en *S. epidermidis*; el más caracterizado es una proteína de unión al fibrinógeno (SdrG/Fbe), que se une a superficies recubiertas con fibrinógeno y promueve la adhesión, además de la agregación plaquetaria. ^[5] También existen otras adhesinas importantes como Embp, que promueve la unión a superficies recubiertas por fibronectina; SdrF/GehD, la unión al colágeno; AtlE es una autolisina que degrada la pared celular bacteriana e induce cambios en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, favoreciendo su

unión a la vitronectina; EbpS para la unión a la elastina, y las proteínas Ses, que más adelante serán descritas. [5, 40, 48]

Es por eso que la fijación inicial a un dispositivo médico puede ocurrir sobre el material virgen (dependiendo de su naturaleza) o sobre materiales recubiertos por proteínas del hospedero. [60]

Agregación celular

Es la fase más importante durante la formación de la biopelícula en *S. epidermidis*; en ella, las células bacterianas que logran adherirse, se multiplican y forman pequeños agregados bacterianos como si se tratara de microcolonias. [5, 37] La estrecha cercanía entre los agregados bacterianos permite la interacción célula a célula y propicia señales químicas a través de metabolitos secundarios (péptidos), que actúan como activadores del sistema *quorum sensing* (QS). El *quorum sensing* es un sistema de comunicación bacteriana, donde se generan moléculas que sirven como señales que inducen la expresión de genes y mecanismos celulares, como la producción del polisacárido (PIA/PNAG) que integra la matriz extracelular de la biopelícula en *S. epidermidis*. [35, 37]

La agregación celular y la acumulación en multicapas que constituyen la biopelícula dependen de la capacidad de las células para realizar la biosíntesis del PIA/PNAG, la molécula PIA/PNAG se sintetiza por la expresión de los productos del operón *icaADBC*, que comprende un gen regulador (*icaR*) y cuatro genes efectores (*icaA*,

icaD, *icaB* e *icaC*). [5] IcaA e IcaD sintetizan una N-acetilglucosamina transferasa (GlcNAc) localizada en la membrana que cataliza la formación de oligómeros de PNAG en el citosol. IcaC es una proteína de membrana que transporta los oligómeros de PNAG (que fueron sintetizados en el citosol) hacia la membrana externa. IcaB es una proteína presente en la pared celular que se encarga de desacetilar los oligómeros de PNAG, introduciendo una carga positiva en los mencionados oligómeros, importante para la adhesión del PNAG a la superficie bacteriana y la interacción electrostática con la pared de otras bacterias (ver **Figura 3**). [37]

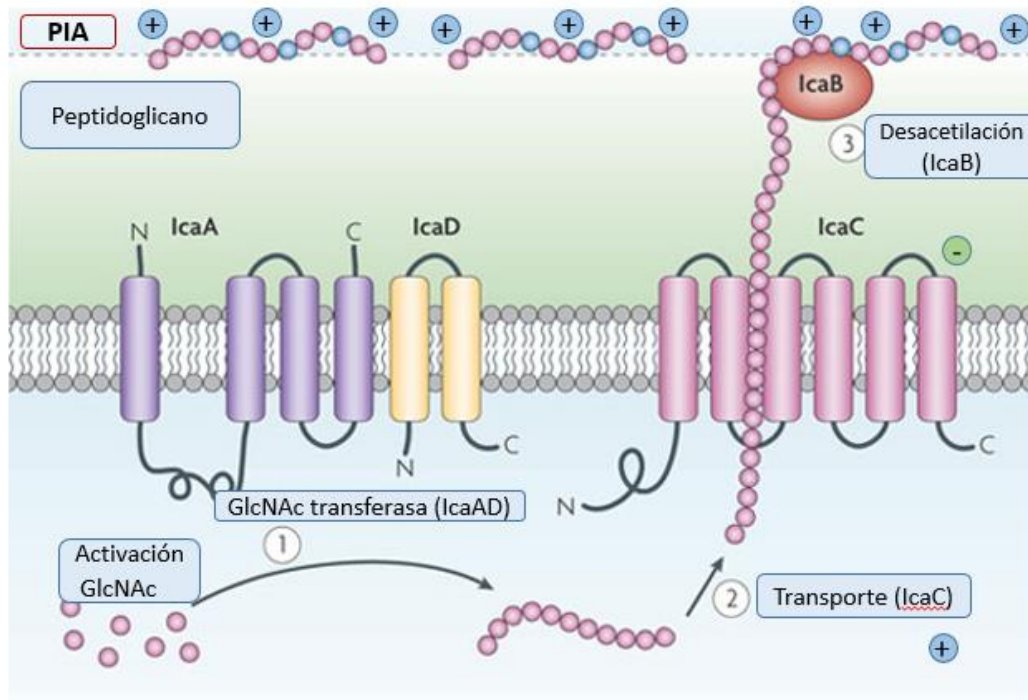


Figura 3. Biosíntesis del PNAG en *Staphylococcus epidermidis*. Modificada de Otto, M., 2012.

Existe un número reducido de cepas de *S. epidermidis* que no poseen el operón *icaADBC*, pero son productoras de biopelícula. [37] En estos casos, la agregación celular y formación de la biopelícula es mediada por factores de carácter proteico que sustituyen funcionalmente al PIA/PNAG, a través de un mecanismo alternativo conocido como PIA independiente. [48] Las principales proteínas mediadoras en este mecanismo son: Aap, Bhp y Embp. [37] En un estudio de Rohde *et al.*, 2007, se reportó que 27% de las cepas formadoras de biopelícula son *icaADBC* negativas (independientes de PIA), y que su mecanismo de formación de biopelícula es en parte mediado por Aap.

Otras moléculas que participan en la agregación celular de la biopelícula son el ADN liberado al medio extracelular producto de la lisis bacteriana (ADN extracelular) y los ácidos teicoicos que favorecen la interacción electrostática con el PNAG, actuando como pegamento. El ADN extracelular es importante para la transferencia de genes de resistencia entre las células bacterianas y aporta rigidez a la estructura final de la biopelícula. [5, 37]

Maduración

En esta etapa, la biopelícula se encuentra metabólicamente activa, aumentando la población bacteriana y asumiendo una estructura tridimensional en forma de “torre u hongo”. Dentro de la matriz extracelular, se forma una red de canales de agua que suministran los nutrientes esenciales a la mayoría de las células que se ubican en el interior de la biopelícula. [37]

Dispersión

La dispersión de las células bacterianas puede ser unicelular o en agregados y está mediada por mecanismos que incluyen fuerzas mecánicas, el flujo sanguíneo y la actividad enzimática extracelular. La diseminación de las células bacterianas hacia otros sitios de infección es primordial para iniciar el ciclo de formación en una nueva superficie. [37] La degradación de la matriz extracelular implica la expresión de genes, como el gen accesorio regulador (*agr*, por sus siglas en inglés: accessory gene regulator), que induce la expresión de proteasas, hidrolasas del PIA/PNAG,

nucleasas para desintegrar el ADN extracelular y moléculas surfactantes (modulinas solubles en fenol o PSMs), que solubilizan los componentes de la matriz, para que la biopelícula pueda dispersarse al estado planctónico, cuando haya escasez de nutrientes o en el momento que la biopelícula presente una alta densidad bacteriana. [40]

4.2 Patogénesis de las biopelículas

S. epidermidis tiene la capacidad de formar biopelículas sobre la superficie de dispositivos médicos, adhiriéndose de manera irreversible; la biopelícula actúa como una barrera física que protege a las células bacterianas de la acción de los antibióticos y de la respuesta inmunológica del hospedero (fagocitosis por leucocitos, y acción por radicales libres de oxígeno, sustancias exógenas y diversas proteasas). [8, 12] A pesar del uso profiláctico de los antimicrobianos, previo a la colocación de un dispositivo médico (lo que reduce la incidencia de una infección), aún no ha sido posible prevenir la contaminación totalmente; ya que, una vez establecida la biopelícula en la superficie del implante, el tratamiento resulta poco efectivo haciendo inevitable el retiro o la sustitución del implante. En muchas ocasiones, las biopelículas se localizan en áreas del cuerpo que son de difícil acceso, dificultando el tratamiento y la erradicación del microorganismo. [12, 40]

Las infecciones causadas por biopelículas representan un reto médico, porque son infecciones que no es posible erradicar totalmente y, por lo tanto, causan episodios recurrentes. Normalmente, los antibióticos son capaces de eliminar a las bacterias en estado planctónico (estado libre), pero no a las bacterias que se encuentran en

la biopelícula. Esto se debe a que dentro de la biopelícula las bacterias son casi mil veces más resistentes a los antibióticos. ^[9] La capacidad de las biopelículas para sobrevivir a altas concentraciones del antibiótico, tiene que ver con un fenómeno multifactorial y complejo que involucra varios mecanismos, como: a) Falla de penetración del antibiótico. Generalmente, la matriz extracelular es una barrera física que impide el paso de los antibióticos, además de que comúnmente contiene carga positiva (catiónica), que modifica la permeabilidad de entrada de antibióticos cargados positivamente, tales como los aminoglucósidos. ^[9] b) Presencia de células persistentes. Estas células son una pequeña subpoblación fenotípica que sobrevive dentro de la biopelícula (no se multiplican ni mueren) ante la exposición prolongada a los antimicrobianos en concentraciones letales, sin presentar mutaciones que les confieran resistencia. ^[29, 51] c) Zonas diferenciadas de actividad metabólica. Dentro de las biopelículas, las bacterias están bajo un gradiente de nutrientes y en consecuencia, las células de la capa superficial o de la periferia de la biopelícula son las metabólicamente activas, comparadas con las células más internas cuyo metabolismo tiende a cero. ^[12, 44] Evidentemente, la mayoría de los antibióticos son efectivos contra las células en crecimiento (fase exponencial) y por lo tanto las células internas no son vulnerables al efecto tóxico de ellos, por ejemplo, la penicilina y la ampicilina no actúan contra células que no están en crecimiento, por lo tanto, las cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas son más activos sobre células en división (fase exponencial). ^[9] Por ello, el fracaso de los tratamientos de elección y la recurrencia de las infecciones asociadas a biopelículas.

Datos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) estiman que al menos el 80% de las infecciones humanas están asociadas a biopelículas, lo que incrementa la estancia hospitalaria y la mortalidad. [40] La problemática mundial de las infecciones asociadas a biopelículas, ha generado la búsqueda de nuevos “blancos”, buscando prevenir y combatir las infecciones por bacterias productoras de biopelículas. Uno de ellos son las proteínas de superficie ancladas a la pared celular de *S. epidermidis*, denominadas CWA (Ses), algunas de las cuales intervienen en la formación de la biopelícula.

4.3 Proteínas de superficie ancladas a la pared (CWA)

4.3.1 Características generales

Las CWA, conforman una familia de proteínas presentes en bacterias Gram-positivas, como *S. epidermidis* (Ses); están ancladas covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y permanecen expuestas a la superficie para interactuar específicamente con las proteínas de la matriz extracelular del hospedero. [7]

Algunas proteínas CWA son cruciales en la patogénesis de *S. epidermidis* y su expresión en la superficie del microorganismo puede darse bajo condiciones *in vitro* o *in vivo*. [7] La presencia de las proteínas CWA es variable entre los estafilococos; en *S. aureus* se han descrito alrededor de 24 proteínas CWA, a diferencia de lo que ocurre en *S. epidermidis*, en el que sólo se han encontrado aproximadamente doce de ellas. [4, 7] En general, conservan una estructura en común: una secuencia señal,

un dominio A ó un dominio central, una región que atraviesa la pared celular y una señal de distribución para el anclaje de la proteína al peptidoglicano. Son secretadas y transportadas a través de la membrana plasmática, mediante el sistema de secreción Sec, para unirse covalentemente al peptidoglicano de la pared celular por medio de transpeptidasas (sortasas) presentes en la membrana celular. [49, 52]

Las proteínas de superficie presentes en *S. epidermidis* (Ses), son: la proteína asociada a la acumulación (agregación celular) de la biopelícula (Aap o SesF), la proteína homóloga asociada a la biopelícula (Bhp o SesD), las proteínas de repetición del dipéptido serina-aspartato (Sdr: SdrG/Fbe y SdrF), la proteína de unión a la matriz extracelular (Embp) y las proteínas SesA a SesJ. [4, 7] Estas proteínas CWA participan en las diferentes fases de formación de la biopelícula, regulando la adherencia primaria y la agregación celular de la biopelícula en *S. epidermidis*. [40, 53]

4.3.2 Clasificación de las proteínas CWA

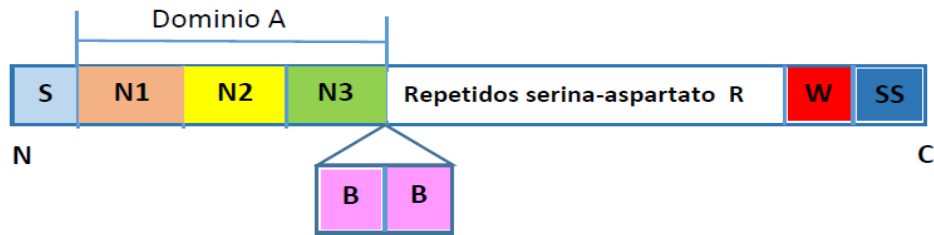
Las investigaciones recientes, sugieren clasificar a las proteínas CWA de los estafilococos en cuatro familias, con base a su estructura y función. [40, 53]

- **Familia MSCRAMMs.** Esta familia está implicada en la adhesión bacteriana a la matriz extracelular del hospedero. Se une a superficies recubiertas por fibrinógeno, colágeno, fibronectina, etcétera. [40] Estas proteínas tienen un extremo N-terminal de aproximadamente 40 aminoácidos; un dominio A en

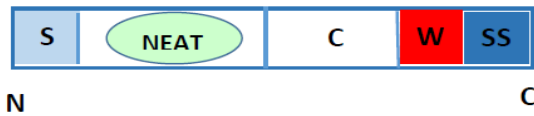
donde está el sitio de unión a ligandos y se divide en regiones N1, N2 y N3; tienen dos dominios B (sólo en los SdrC-E) denominados B_{SDR}, y una región R (SD repeats R) con repeticiones de serina-aspartato previa a la región de anclaje (W). En el extremo C-terminal, contienen una secuencia de distribución para el anclaje de la proteína al peptidoglicano (SS). [7, 19, 53]

- **Familia de motivos NEAT** (por sus siglas en inglés Near Iron Transporter motif protein family). Esta familia de proteínas contiene un dominio de transportador de hierro. Su función es unir hierro o hemoglobina y facilitar el transporte de éstos hacia el interior de la bacteria. [40]
- **Familia de proteínas de paquetes de tres hélices** (del inglés, three helical bundle motif family). Esta familia contiene en el N-terminal, una proteína A con cuatro o cinco módulos homólogos que consiste un paquete de tres hélices estructurado de manera independiente que puedan unir diferentes ligandos. [53]
- **Familia de repetidos de G5-E** (del inglés G5-E repeat family). Contiene dominios alternados de G5 y E, el dominio G5 se caracteriza por cinco residuos conservados de glicina dentro de un segmento de 78 residuos que forma seis hojas beta; y el dominio E es un segmento espaciador de 50 residuos similar a G5. [40]

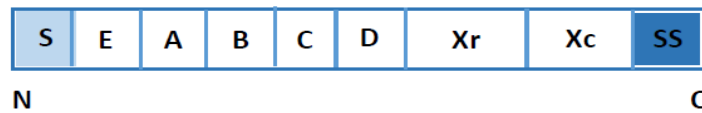
A) MSCRAMMs familia de proteínas Sdr



B) Familia de motivos NEAT



C) Familia de proteínas de paquetes de tres hélices



D) Familia de repetidos G5-E

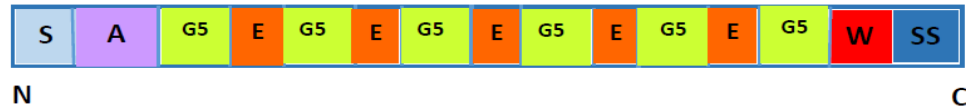


Figura 4. Esquematación de la clasificación en familias de las proteínas de superficie ancladas covalentemente a la pared de *S. epidermidis* (CWA). La estructura de las familias de las proteínas en general, es la siguiente: **A) Familia MSCRAMMs.** En el N-terminal, una secuencia señal (S) representada en color azul claro, un dominio central letra A en donde están los subdominios N1-N3, B1-B2, son regiones que se desconoce su función, la región (R), son repeticiones dipeptídicas de serina-aspartato, tienen una región que atraviesa la pared celular (W) en color rojo, y en el C-terminal una señal que dirige la proteína (SS) representada en color azul fuerte. **B) Familia de motivos NEAT,** después de la secuencia señal (S) tiene un dominio NEAT, una región C-terminal hidrofílica (C), previo a los segmentos W y SS. **C) Familia de proteínas de paquetes de tres hélices,** después del N-terminal (N), hay varias regiones de paquetes de tres hélices (E, A, B, C, D), seguida de dos dominios Xr y Xc previos al C-terminal. **D) Familia de repetidos de G5-E,** después de la secuencia señal (S), un dominio A diferente de las MSCRAMMs, seguido de repetidos alternados de dominios G5-E y al final los dominios W y SS (Modificada de Foster *et al.*, 2014; Speziale *et al.*, 2014).

4.3.3 Procesamiento, secreción y anclaje

En bacterias Gram positivas como *S. epidermidis* la síntesis de las proteínas CWA se realiza en los ribosomas, iniciando desde extremo N-terminal hacia el carboxilo C-terminal. Las proteínas CWA tienen una secuencia señal (péptido señal) en el amino N-terminal de aproximadamente 40 aminoácidos (S, por el término en inglés; Secretory signal sequence), encargada de guiar a la proteína hacia su destino dentro de la célula. Este péptido señal será reconocido y dirigirá a la proteína al sistema de secreción Sec, para que sea exportada a través de la membrana plasmática, después tienen un dominio A o dominio central que es variable entre las familias de proteínas. Y por último en extremo carboxilo C-terminal, una región de anclaje para la proteína que atraviesa la pared celular bacteriana (W, por el término en inglés: Wall spanning region), seguida una señal de distribución para el anclaje covalente de la proteína al peptidoglicano (SS, por el término en inglés: Sorting signal).^[53] Además de una secuencia específica de aminoácidos de Leucina-Prolina-X-Treonina-Glicina (LPXTG, por el término en inglés: leu-pro-x-thr-gly, donde X es cualquier aminoácido), que está entre la región (W) y la señal de distribución (SS), la cual; es procesada por una enzima (transpeptidasa) sortasa A (del término en inglés: sortase A), que corta el péptido entre los aminoácidos treonina (T) y glicina (G) catalizando la unión covalente del grupo carboxilo de la treonina con el grupo amino del peptidoglicano mediante una reacción de transpeptidación.^[53, 60]

4.4 Proteínas de superficie de *S. epidermidis* (Ses)

Se denominan proteínas de superficie de *S. epidermidis* (Ses, por sus siglas en inglés: *Staphylococcus epidermidis* surface protein). De acuerdo a Bowden *et al.*, 2005, se encontraron por estudios bioinformáticos como homólogos en *S. epidermidis* RP62A, identificando diferentes CWA (Ses) con una estructura conservada de aminoácidos para poder anclarse al peptidoglicano de la pared celular del microorganismo; seguido de un dominio hidrofóbico transmembranal y varios aminoácidos cargados positivamente en el C-terminal, además de una secuencia señal en el N-terminal. La función de algunas de estas proteínas CWA todavía no es clara, ya que el campo de estudio aún está en investigación. ^[18]

Las proteínas de superficie Ses que se han descrito son: A, C, D, E, F, G, H e I y más reciente Ses J. ^[7] SesH, SesG y SesI, pueden usarse como marcadores de patogenicidad. ^[18] A continuación solo las proteínas Aap (SesF), Bhp (SesD), SesC, SdrF y SdrG (Fbe) serán detalladas. Cabe señalar que el perfil de las proteínas varía entre cada cepa dependiendo del sitio donde se aísle, ya sea de cepas aisladas de infección o de tejido sano (piel).

4.5 Aap (SesF)

La proteína asociada a la acumulación (Aap, por sus siglas en inglés: accumulation-associated protein), conocida como SesF es homóloga a SasG en *S. aureus*, es una proteína extracelular con un tamaño de 246.3 kDa. ^[7] Fue encontrada en *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984), pertenece a la familia de los repetidos de G5-E

y su función es promover la unión primaria a superficies e inducir la agregación celular durante la formación de la biopelícula. [40, 53] Aap, está presente en aproximadamente 90% de las cepas de *S. epidermidis*. [18] Tiene un dominio A (amino N-terminal), que facilita la unión a los corneocitos (células de queratina, que hacen que la epidermidis sea hidrófoba) permitiendo la colonización de la piel. Este dominio, después es proteolizado para que las regiones del dominio B (5 a 17 repetidos) puedan interactuar y promuevan la agregación celular de la biopelícula que es mediada por Zn^{2+} ; y después, una región denominada E (G5-E) con cinco residuos de glicina conservados. [18, 53, 58] En el carboxilo (C-terminal), se localiza una secuencia de aminoácidos LPDTG de reconocimiento de la sortasa A. [7]

4.6 Bhp (SesD)

La proteína homóloga asociada a la biopelícula (Bhp, por sus siglas en inglés: Biofilm associated homolog protein); conocida como SesD, tiene un tamaño de 250 kDa, fue identificada inicialmente como la proteína AAK29746 (NCBI) en *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) y su función es inducir la agregación celular de la biopelícula en ausencia de PIA. [7] Aproximadamente está presente en un 15 a 45% de las cepas aisladas. [5, 18]

4.7 SesC

Es una proteína con un tamaño de aproximadamente 68 kDa, y se expresa durante el crecimiento de la biopelícula. [7] Diversos ensayos inmunológicos de expresión de la proteína en cultivos aislados sugieren que SesC es fundamental para la formación de la biopelícula. [18] Sin embargo; aún no se ha determinado su función molecular en la formación de la biopelícula. [4] Más adelante se detallará que esta proteína puede ser blanco potencial de generación de vacunas contra *S. epidermidis*.

4.8 SdrF y SdrG (Fbe)

Las proteínas SdrF y SdG (Fbe), pertenecen a la subfamilia MSCRAMMs, con una región de repetidos SD (Sdr, por sus siglas en inglés: Serine-aspartate dipeptide repeat protein). [4] La proteína de unión al colágeno (SdrF), tiene un tamaño de 175 kDa, y se une con alta afinidad a superficies hidrófobas recubiertas de colágeno del hospedero. [7]

La proteína de unión a fibrinógeno (SdrG/Fbe), por sus siglas en inglés: fibrinogen-binding protein), tiene un tamaño de 93.7 kDa y es necesaria para la unión primaria de *S. epidermidis* a superficies recubiertas de fibrinógeno humano; promoviendo la adhesión y agregación plaquetaria en complicaciones trombóticas causadas por *S. epidermidis*. [5, 7, 58] El gen que codifica para SdrG/Fbe es común en aislados clínicos de *S. epidermidis*. [8] De acuerdo a un estudio por Van Mellaert *et al.*, 2012, indican que un 78% de cepas aisladas de infección ortopédica tienen el gen, mientras que el 91% fue encontrado en cepas aisladas de infección de catéter.

4.9 Proteínas Ses y su potencial como antígenos vacunales

A causa de la creciente problemática de salud que están representando las infecciones asociadas a los dispositivos médicos; ha surgido la necesidad de investigar alternativas preventivas de inmunoprofilaxis e inmunoterapia para evitar el riesgo patogénico de *S. epidermidis* con la formación de biopelículas. [58] El desarrollo de una vacuna contra *S. epidermidis* es una de las estrategias más prometedoras en pacientes que van a ser implantados con algún dispositivo médico, donde existe el riesgo de una infección estafilocócica por biopelícula, así como en pacientes que estén en estado grave, inmunocomprometidos y neonatos. En estos casos, si la vacuna resulta efectiva, actuaría disminuyendo la morbilidad y mortalidad asociadas a infecciones por *S. epidermidis* que en los últimos años han ido en aumento. [12, 58] Sin embargo, *S. epidermidis* al ser un comensal de la piel, puede estar en contacto con el sistema inmunológico, por lo tanto, los anticuerpos anti *S. epidermidis* están presentes de forma basal. En consecuencia, el desarrollo de una vacuna con células enteras de *S. epidermidis* tendría poca probabilidad de ser protectora, comparada con las vacunas tradicionales. [58]

Las proteínas: SdrG, SdrF, y las proteínas Ses; se han convertido en blancos potenciales para el desarrollo de vacunas con la finalidad de inhibir con éstas la fase inicial en la formación de la biopelícula por *S. epidermidis*. [58] Investigaciones recientes, detectaron títulos de anticuerpos más altos de las proteínas (Ses): SesG, SesH y SesI en sueros de pacientes convalecientes con infección por *S. epidermidis*, concluyendo que la expresión de dichas proteínas ocurre durante el proceso infeccioso. [58]

Shahrooei *et al.*, 2012, amplificaron el gen *sesC* en el 100% de sus aislados, mientras que Yao *et al.*, reportan la presencia del gen en un 86% en cepas clínicas y un 55% en cepas comensales, indicando un posible papel de SesC durante la patogénesis de *S. epidermidis*.^[58] Es probable que SesC sea un blanco potencial para el desarrollo de una vacuna en infecciones asociadas a biopelículas y que los anticuerpos anti-SesC, sean utilizados como inmunoterapia.^[8, 58]

Para SdrG, se ha visto que el gen se encuentra preferentemente en la forma invasiva de *S. epidermidis*, y no en la forma comensal. Estos datos hacen de SdrG otro candidato potencial para generar vacunas que puede distinguir entre cepas invasivas y cepas comensales de *S. epidermidis*.^[58]

Un aspecto importante a considerar para el desarrollo de una vacuna contra *S. epidermidis*, es el costo-eficiencia de la vacuna, la cual puede funcionar tanto en pacientes que solo tienen implantes de corto plazo como catéteres venosos, así como en pacientes con dispositivos médicos permanentes. En este último caso, la aplicación de la vacuna sería una inversión económica más favorable que brindaría protección inmunológica al paciente y evitaría la eliminación ó sustitución del dispositivo además de probables recaídas de la infección.^[58]

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo: Transversal

5.2 Cepas de estudio

Se incluyeron 51 cepas donadas del acervo microbiológico del Laboratorio de Infectología del INR, que fueron aisladas de infecciones asociadas a prótesis articulares (cadera y rodilla) de pacientes del INR en el periodo de 2011 a 2015. Adicionalmente se analizaron 24 cepas aisladas de piel sana (fosa cubital del brazo) de individuos sin prótesis articular utilizadas como cepas control en un estudio previo del INR, para un total de 75 cepas analizadas durante el estudio.

Resiembra de cepas: las 75 cepas del estudio fueron previamente descongeladas y sembradas en placas ASC se incubaron durante 18 a 24 horas a 37°C para tener cepas viables. Las cepas de referencia utilizadas fueron *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* ATCC 43300.

5.3 Identificación de las cepas y susceptibilidad antimicrobiana

La identificación bacteriana se realizó mediante el sistema automatizado VITEK 2-compact (BIOMÉRIEUX, Francia), empleándose tarjetas para GP (cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos); de la misma forma se obtuvo el perfil de susceptibilidad antimicrobiana utilizando las tarjetas AST-GP67, las cuales fueron

procesadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los 15 antibióticos que se probaron fueron: penicilina (PE), oxacilina (OXA), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LVX), moxifloxacina (MXF), gentamicina (GN), vancomicina (VN), eritromicina (E), clindamicina (CLI), synercid: estreptograminas A y B (SYN), linezolid (LZD), tetraciclina (TE), rifampicina (RF) y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), nitrofurantóina (NIT).

5.4 Formación de biopelícula *in vitro*

La detección de formación de biopelículas por las cepas de *S. epidermidis* se realizó por medio un ensayo semicuantitativo *in vitro* por el método de tinción con cristal violeta. ^[11] Este método, se basa en el crecimiento de colonias bacterianas durante 24 horas en una microplaca de dilución, y la adherencia bacteriana en la parte inferior de la microplaca evidencia la formación de biopelículas, la cual es lavada, teñida con cristal violeta y detectada midiendo la densidad óptica de las biopelículas formadas de acuerdo a los criterios de Stepanović *et al.* ^[55]

-Procedimiento:

Después de la resiembra de las cepas de *S. epidermidis* en ASC, se tomó una asada de cada cepa y se inoculó en tubos de ensaye que contenían 2mL de caldo soya tripticasa adicionado con glucosa al 2%(TSB-G) se incubaron 24 horas a 37°C (incubadora bacteriológica BINDER, USA). Se realizó una suspensión al 0.5 en la escala de MacFarland (1.5×10^8 células/mL) en medio TSB con el nefelómetro (DensiCHEK-plus BIOMÉRIEUX, Francia). El crecimiento de la biopelícula se hizo

en una microplaca de poliestireno estéril fondo plano de 96 pocillos (marca Nunc), donde se colocaron 180µL de medio TSB-G al 2% y 20µL de la suspensión de cada aislado. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C en condiciones estáticas. Después del tiempo de incubación se decantó el medio de cultivo (sobrenadante), se realizaron tres lavados con 200µL de solución salina al 0,85% (p/v) para eliminar las células bacterianas que crecieron en forma libre dejándose secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente se agregaron 150µL de la solución de cristal violeta al 0.1% (p/v) a cada uno de los pocillos, se dejó actuar durante 20 minutos, se decantó el colorante, se realizaron tres lavados para eliminar el exceso del mismo y se dejó secar a temperatura ambiente 20 minutos. A continuación a cada pocillo se le agregaron lentamente 150µL de etanol al 95% para suspender el colorante y realizar la medición indirecta de bacterias adheridas tanto al fondo como en las paredes del pocillo. Se dejaron secar a temperatura ambiente sin agitar por 20 minutos. Finalmente se midió la densidad óptica (DO) de la microplaca en un espectrofotómetro para placas de ELISA (xMark™, BIO-RAD) a una $\lambda = 490$ nm. La absorbancia del cristal violeta es directamente proporcional a la cantidad de biopelícula producida.

Los aislados se inocularon por cuadruplicado. Como control negativo se utilizó *S. epidermidis* ATCC 12228 cepa no productora de biopelícula y control positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 cepa productora de biopelícula.

5.5 Interpretación de la lectura de las microplacas para caracterización de biopelículas

Por cada aislado se calculó el promedio de la densidad óptica obtenida en las cuatro réplicas, y se calculó la desviación estándar para verificar la correlación entre los resultados obtenidos. La interpretación del tipo de biopelícula se realizó con base en la densidad óptica resultante de la cepa usada como control negativo de *S. epidermidis* (ATCC 12228), y los criterios de Stepanović *et al.* ^[55] (**Tabla 2**).

Tabla 2. Criterios de interpretación del tipo de biopelícula.

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

- DO= densidad óptica

5.6 Caracterización genotípica

5.7 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de las 75 cepas de *S. epidermidis* se utilizó la resina Chelex-100 al 10% (BIO-RAD), que es una resina quelante de iones metálicos que protege al ADN de los contaminantes celulares. Primero se tomó una pequeña asada de los aislados en ASC equivalente a 1.5×10^8 células/mL y se depositaron en tubos eppendorf estériles de 1.5mL que contenían 300 μ L de solución salina. Las muestras se suspendieron por agitación durante 20 segundos y fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos (Micro CL 21 centrifuge, Thermo Fisher Scientific™). Se retiró el sobrenadante dejando el botón en el fondo de tubo y se agregaron 200 μ L de resina Chelex-100 al 10% (BIO-RAD), la suspensión se homogenizó con vortex y se colocó en un termobloque (Heating Block Fisher Scientific™) a 96°C durante 40 minutos. Posteriormente las muestras se suspendieron por agitación durante 10 segundos y se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos. Se tomaron aproximadamente 100 μ L del sobrenadante que contenía el ADN extraído evitando tocar las perlas de la resina Chelex-100 y se depositaron en una nueva serie de tubos eppendorf estériles para ser etiquetados y almacenados a -20°C hasta su posterior uso en la reacción de la PCR, en tanto que los tubos eppendorf con el botón se desecharon.

5.8 Amplificación del gen *mecA*

La detección del gen *mecA* se realizó por PCR punto final. Fueron utilizados cebadores diseñados por Louie *et al.* [31] La mezcla de reacción contenía: 5µL de *buffer* 10X, 3mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 4mM dNTPs (Invitrogen), 2.5 U de Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 25pmol de cada oligonucleótido (Sigma Aldrich), 20ng (5µL) de ADN molde y agua grado biología molecular (estéril, libre de nucleasas y ADNasas) para un volumen final de 50 µL por muestra de reacción. Para la amplificación se utilizó un termociclador Veriti (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 32 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación 55°C por 30 segundos y extensión 72°C por 45 segundos), seguido de una extensión final a 72°C por 10 minutos de polimerización. Los productos de la PCR se detectaron por electroforesis a 100 volts durante 1 hora en gel de agarosa al 1% (Invitrogen). El marcador de peso molecular fue una escalera de 100pb (1.5µL) (Invitrogen), 3µL de colorante SYBR Green (intercalante tipo bromuro de etidio) y como control positivo la cepa de *S. aureus* ATCC 43300. Los geles fueron fotografiados en el fotodocumentador (BIO-RAD GeL DOcXR+ Image Lab Software).

5.9 Amplificación de los genes *ses* de *S. epidermidis*: *sdrF*, *sdrG*, *sesA*, *sesB*, *sesC*, *sesD* (*bhp*), *sesE*, *sesF* (*aap*), *sesG*, *sesH*, y *sesI*

Para la amplificación por PCR punto final de los genes *ses*: *sdrF*, *sdrG*, *sesA*, *sesB*, *sesC*, *sesD* (*bhp*), *sesE*, *sesF* (*aap*), *sesG*, *sesH*, y *sesI*, se utilizaron cebadores que previamente fueron diseñados en el laboratorio (**Tabla 3**). La mezcla de reacción contenía: 5µL de *buffer* 10X, 6 de MgCl₂ (Applied Biosystems), 1 dNTPs (Invitrogen), 1.5 U de Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 10pmol de cada oligonucleótido (Sigma Aldrich), 20ng (5µL) de ADN molde y agua grado biología molecular para un volumen final de 50µL por muestra de reacción. Para la amplificación se utilizó el mismo termociclador Veriti (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación 57°C por 45 segundos y extensión 72°C por 45 segundos), seguido de una extensión final a 72°C por 7 minutos de polimerización. Los productos de la PCR se detectaron por electroforesis a 120 volts durante 1 hora en gel de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular fue una escalera de 100pb (1.5µL) (Invitrogen), 3 µL de colorante SYBR Green (intercalante tipo bromuro de etidio) y como control positivo la cepa de *S. epidermidis* (ATCC 35984). Los geles fueron fotografiados en el fotodocumentador (BIO-RAD Gel Doc XR⁺ Image Lab Software).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes *ses* de *S. epidermidis*.

Gen	Iniciadores	Secuencia del oligonucleótido	Tm	Tamaño amplicón (pb)
<i>sdrF</i>	Adelante	5´-TTC AAT ACT CGT GGG TGC TAC- 3´	54.5 °C	146
	Atrás	5´-CGA TAA AGA GGT GAC AGA GAA CG- 3´	55.0 °C	
<i>sdrG</i>	Adelante	5´-CAG TCA GAA CAG ATG AAG AGG G- 3´	54.8 °C	146
	Atrás	5´-ATT GCC TTC TGA GTC TAG TGC- 3´	54.6 °C	
<i>sesA</i>	Adelante	5´-TCT GCT ATT AGT CCT GCA ACG- 3´	54.5 °C	190
	Atrás	5´-GAG TTG ACT GCG CTT GAT TG- 3´	54.5 °C	
<i>sesB</i>	Adelante	5´-CAA TGA CAC AAC GAC ACA TGC- 3´	55.0 °C	173
	Atrás	5´-CGA CAC CAG CAC CAG ATT TA- 3´	54.9 °C	
<i>sesC</i>	Adelante	5´-GTG TCT ACC TCA AGC TGT CAT G-3´	55.3 °C	153
	Atrás	5´-GTT GGA TTT TGT CAG CGA TGG- 3´	54.6 °C	
<i>sesD (bhp)</i>	Adelante	5´-TGA AGT AGC TGT TGG TTT CGG -3´	55.2 °C	181
	Atrás	5´-CGT ATT CTT ACC GTG ACT CTG AC- 3´	54.8 °C	
<i>sesF (aap)</i>	Adelante	5´-GCT GGT AAA ACT TGG ACG GC- 3´	56.8 °C	131
	Atrás	5´-GCT CTC ATA ACG CCA CTT GC- 3´	56.5 °C	
<i>sesG</i>	Adelante	5´-CAT CGC AAC AGA GAC AAA AGG- 3´	54.3 °C	156
	Atrás	5´-GCT ATT TGG GTT GCT TCA CC- 3´	54.4 °C	
<i>sesH</i>	Adelante	5´-AGG AGA AAA GCC CAG TAA TAC C- 3´	54.3 °C	154
	Atrás	5´-TCT TTT GTT TTA CCT GTT TCC GG- 3´	53.8 °C	
<i>sesI</i>	Adelante	5´-CGG GTT CTC TAT CAA TTG GAG G- 3´	55.4 °C	176
	Atrás	5´-GTT TGC GTC TCT AGG AGT CTG- 3´	54.9 °C	
<i>mecA</i>	Adelante	5´ -AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3´	64.1 °C	533
	Atrás	5´ -AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3´	65.5 °C	

6. RESULTADOS

6.1 Cepas de estudio

Se analizaron un total de 75 cepas de *S. epidermidis* aisladas de dos diferentes nichos (piel sana e infección de prótesis articular), 24 de las cepas corresponden a piel sana de individuos sin prótesis articular (PS) y las 51 restantes a aislados de infección de prótesis articular (IPA); de diferentes pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”. Las características demográficas de los pacientes con IPA fueron las siguientes: 59% (n=30) corresponden al sexo femenino y 41% (n=21) al sexo masculino. El intervalo de edad de todos los pacientes era entre 23 y 95 años. Las articulaciones infectadas de donde se aislaron las cepas fueron: 82% (n=42) de cadera y 18% (n=9) de rodilla.

6.2 Resultados de susceptibilidad antimicrobiana

En la **Tabla 4**, se muestra el porcentaje de la resistencia antimicrobiana que presentaron las cepas a los antibióticos probados. En ambos grupos, las cepas presentaron los más altos porcentajes de resistencia a los siguientes antibióticos: penicilina; PS (96%) e IPA (80%), y oxacilina; PS (25%) e IPA (78%). Todas las cepas fueron sensibles a synercid (estreptograminas A y B), linezolid, vancomicina y nitrofurantoína.

A todas las cepas oxacilina resistentes 81% (n=46) se les buscó la presencia del gen *mecA*; de las cepas de PS, 6 tienen el gen *mecA*, mientras que en las cepas IPA, 40 poseen dicho gen, ver **Figura 5**.

Tabla 4. Porcentaje de resistencia antimicrobiana en las cepas analizadas.

Antibiótico	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (N_T=75)	
	PS (%)= 32 R (%)	IPA (%)= 68 R (%)
Penicilina	96	80
Oxacilina	25	78
Ciprofloxacina	12	61
Levofloxacina	12	61
Moxifloxacina	12	56
Gentamicina	12	43
Vancomicina	0	0
Eritromicina	50	39
Clindamicina	33	27
Synercid (estreptograminas A y B)	0	0
Linezolid	0	0
Tetraciclina	18	18
Rifampicina	0	10
Trimetoprim/sulfametoxazol	25	41
Nitrofurantoína	0	0

N_T = Total de aislados de *S. epidermidis*

R (%) = de aislados resistentes

PS (%) = Aislados de Piel sana

IPA (%) = Aislados de Infección protésica articular

Tabla 5. Resultados de la caracterización genotípica de las cepas de piel sana (PS) de *S. epidermidis*.

Cepa	Tipo de muestra	Tipo de biofilm	<i>mecA</i>	Genes <i>ses</i> que codifican para las proteínas Ses										
				<i>sdrF</i>	<i>sdrG</i>	<i>sesA</i>	<i>sesB</i>	<i>sesC</i>	<i>sesD</i> (bhp)	<i>sesE</i>	<i>sesF</i> (aap)	<i>sesG</i>	<i>sesH</i>	<i>sesI</i>
Productoras fuertes (PF)														
P2	2	PF	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
P8	2	PF	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
P9	2	PF	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
P56	2	PF	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
Productoras débiles (PD)														
P24	2	PD	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P50	2	PD	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
No productoras (NP)														
P3	2	NP	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P7	2	NP	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
P46	2	NP	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
P10	2	NP	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
P13	2	NP	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
P59	2	NP	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
P48	2	NP	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
P51	2	NP	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
P62	2	NP	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
P15	2	NP	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
P23	2	NP	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
P35	2	NP	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P47	2	NP	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
P55	2	NP	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
P5	2	NP	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
P6	2	NP	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
P20	2	NP	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
P57	2	NP	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0

Cepa: (P)=Aislados de piel

Tipo de muestra: 2=Piel sana

Tipo de biofilm (biopelícula): PF=productor fuerte, PD=productor débil, NP= no productor

mecA y genes *ses*: (0): Negativo, (1): Positivo

Tabla 6. Resultados de la caracterización genotípica de las cepas clínicas (IPA) de *S. epidermidis*.

Cepa	Tipo de muestra	Tipo de biofilm	mec A	Genes ses que codifican para las proteínas Ses										
				sdrF	sdrG	sesA	sesB	sesC	sesD (bhp)	sesE	sesF (aap)	sesG	sesH	sesI
Productoras fuertes (PF)														
S1504	1	PF	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S1467	0	PF	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
S113	0	PF	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
S162	0	PF	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
S1373	1	PF	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
S274	0	PF	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S536	0	PF	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S1249	0	PF	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S563	0	PF	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
S583	0	PF	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
S587	0	PF	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S661	0	PF	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
S848	0	PF	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Productoras débiles (PD)														
S112	0	PD	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
S099	0	PD	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S319	0	PD	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S104	0	PD	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
S352	0	PD	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
S675	0	PD	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
S1052	0	PD	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S1178	1	PD	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
S1571	1	PD	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
S1302	0	PD	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
No productoras (NP)														
S336	0	NP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S418	0	NP	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
S660	1	NP	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
S1261	1	NP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S1013	0	NP	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
S085	0	NP	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
S100	1	NP	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S174	0	NP	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0

S267	0	NP	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Cepa	Tipo de muestra	Tipo de biofilm	<i>mecA</i>	Genes <i>ses</i> que codifican para las proteínas Ses										
				<i>sdrF</i>	<i>sdrG</i>	<i>sesA</i>	<i>sesB</i>	<i>sesC</i>	<i>sesD</i> (bhp)	<i>sesE</i>	<i>sesF</i> (aap)	<i>sesG</i>	<i>sesH</i>	<i>sesI</i>
S273	0	NP	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
S353	0	NP	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
S422	0	NP	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S534	0	NP	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
S569	0	NP	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S588	0	NP	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
S591	0	NP	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S647	0	NP	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
S830	0	NP	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S894	0	NP	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
S1143	0	NP	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
S1149	0	NP	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
S1259	0	NP	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S1262	0	NP	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
S1321	0	NP	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
S1328	0	NP	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
S1435	0	NP	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S1454	1	NP	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
S1471	1	NP	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0

Cepa: (S)= Aislados de infección

Tipo de muestra: 0=cadera y 1=rodilla

Tipo de biofilm (biopelícula): PF=productor fuerte, PD=productor débil, NP= no productor

mecA y genes *ses*: (0): Negativo, (1): Positivo

6.3 Amplificación del gen *mecA*

Se realizó PCR punto final para detectar la presencia del gen *mecA*, en las cepas que presentaron resistencia a oxacilina. En la **Figura 5**, se muestra un ejemplo de los productos de la PCR para el gen *mecA*.

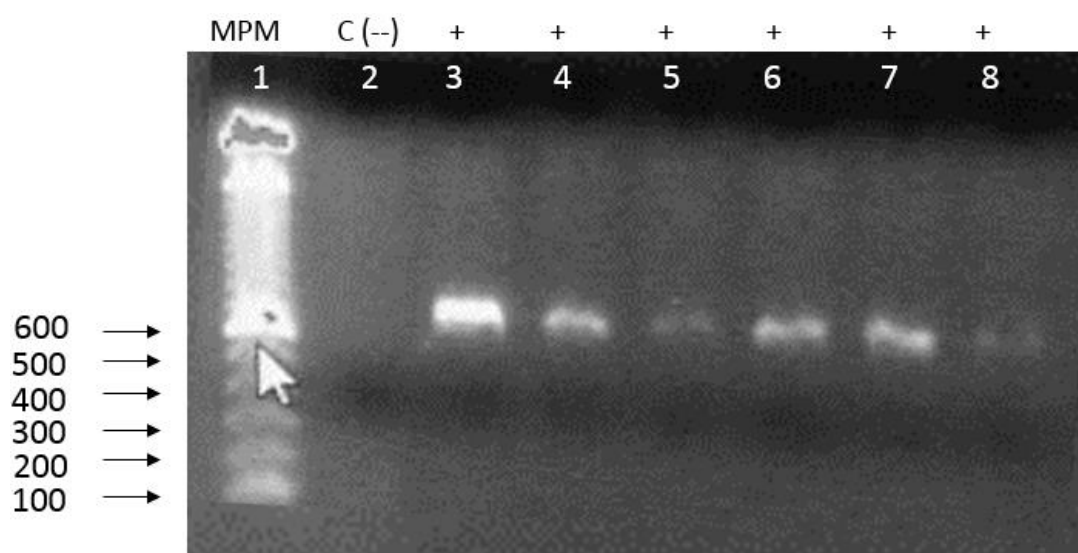


Figura 5. Gel representativo de los productos de la PCR para el gen *mecA* en las cepas oxacilino resistentes. Carril 1 (MPM escalera de 100 pb-*in vitro*gen), carril 2: control negativo (*S. aureus* ATCC 29213), carril 3: control positivo (*S. aureus* ATCC 43300), carril 4: aislado PS57, carril 5: aislado PS56, carril 6: aislado PS50, carril 7: aislado PS20 y carril 8: aislado PS6.

6.4 Formación de biopelículas *in vitro*

Para detectar la formación de biopelículas se realizó un ensayo semicuantitativo *in vitro* utilizando el método de tinción con cristal violeta, el cual distingue entre cepas productoras fuertes (PF), productoras débiles (PD) y no productoras (NP), ver **Figura 6**.

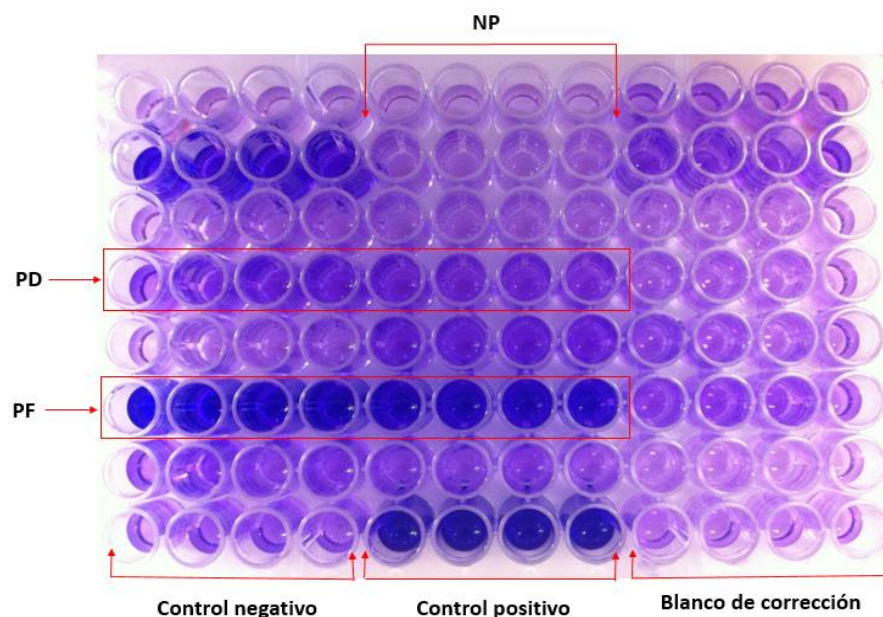


Figura 6. Formación de biopelículas *in vitro* por el método de cristal violeta. Se ejemplifican algunos de los aislados de PS por cuadruplicado en placas de ELISA. El control positivo es *S. epidermidis* (ATCC 34984), el control negativo *S. epidermidis* (ATCC 12228) y el blanco de corrección es caldo soya tripticasa (TSB-G) adicionado con glucosa al 2%.

Tabla 7. Criterios de interpretación del tipo de biopelícula.

Tipo de biopelícula	Criterio
No productor (NP)	DO control negativo = 0.034 DOM ≤ 0.068
Productor débil (PD)	2 (DO) control negativo = 0.068 0.068 ≤ DOM ≤ 0.136
Productor fuerte (PF)	4 (DO) control negativo = 0.136 DOM ≥ 0.136

- DOM= densidad óptica de la muestra

Posteriormente se comparó la formación de biopelículas en ambos grupos (PS e IPA); el porcentaje predominante en ambos grupos es el de cepas no productoras de biopelícula (NP) representado en color amarillo, ver **Figura 7**.

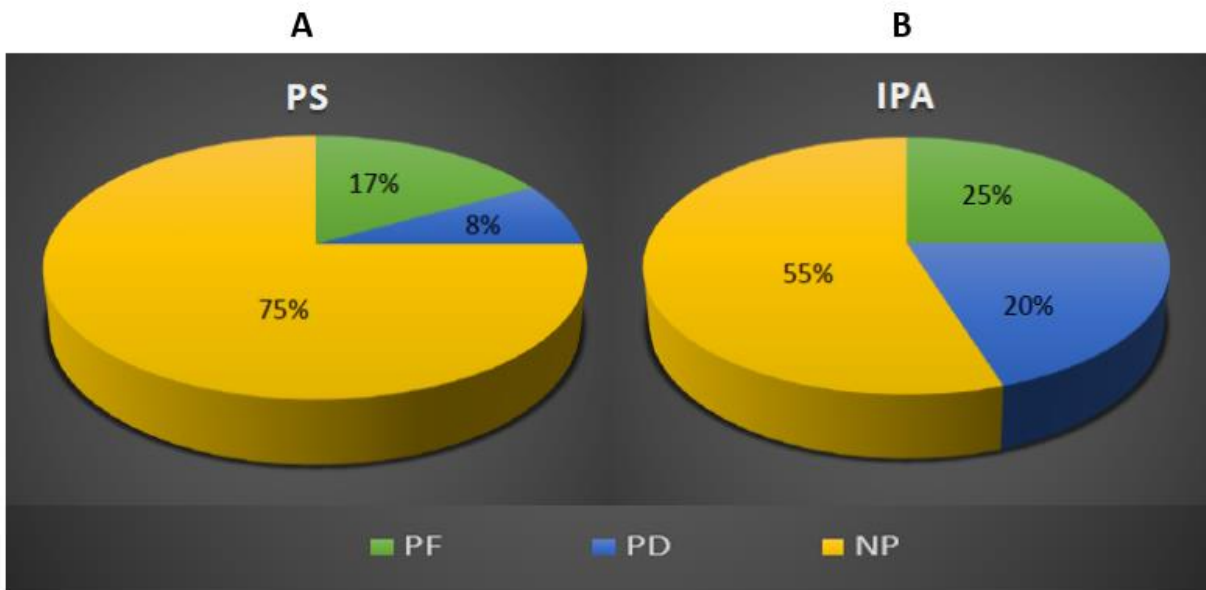


Figura 7. Resultados de la formación de biopelículas *in vitro*. **A)** Aislados de piel sana (PS); **B)** Aislados de infección de prótesis articular (IPA). Productor fuerte (PF) en color verde, productor débil (PD) en color azul y no productor (NP) en color amarillo.

6.5 Detección de los genes *ses*

En la **Figura 8 y 9**, se muestra un ejemplo de los productos de la PCR punto final para los once genes *ses*: *sdrF*, *sdrG* (*fbe*), *sesA*, *sesB*, *sesC*, *sesD* (*bhp*), *sesE*, *sesF* (*aap*), *sesG*, *sesH*, y *sesI* en la cepa de referencia de *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984).

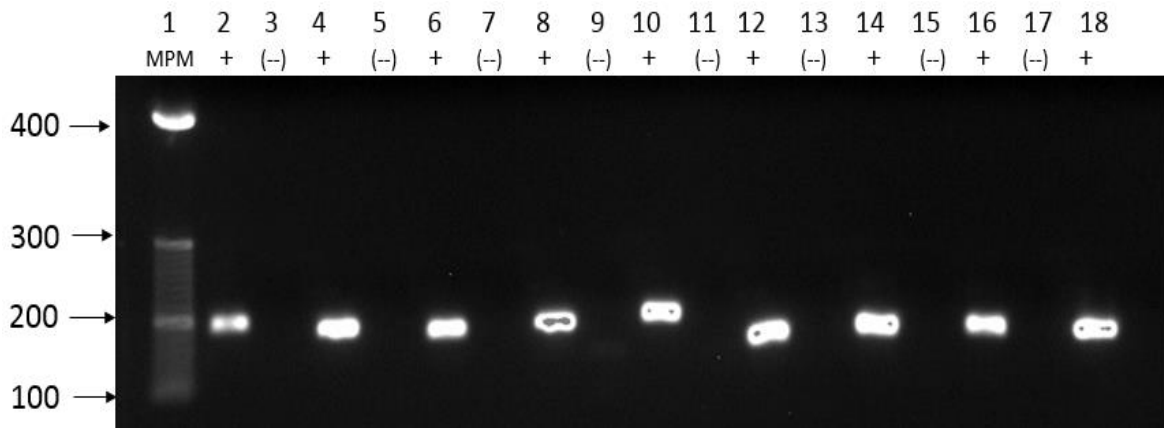


Figura 8. Gel representativo de los productos de la PCR para los genes *ses* de la cepa de referencia RP62A (ATCC 35984, control positivo). Carril 1 (MPM escalera de 100pb-Invitrogen), carril 2: *sesA* (190 pb), carril 4: *sesB* (173 pb), carril 6: *sesC* (153 pb), carril 8: *sesD* (*bhp*) (de 181 pb), carril 10: para *sesE* (199 pb), carril 12: *sesF* (*aap*) (131 pb), carril 14: *sesG* (156 pb), carril 16: *sesH* (154 pb), carril 18: *sesI* (176 pb). Los carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 son controles negativos (mezcla de reacción sin ADN).

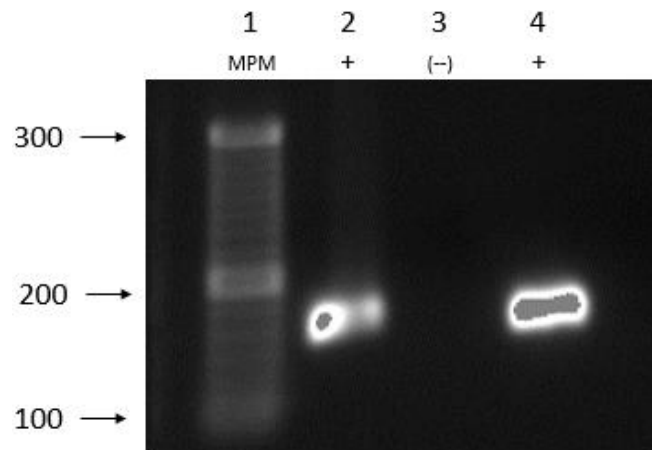


Figura 9. Gel representativo de los productos de la PCR para los genes *ses* de la cepa de referencia RP62A (ATCC 35984, control positivo). Carril 1 (MPM escalera de 100pb-Invitrogen), carril 2: *sdrF* (146 pb), carril 4: *sdrG* (146 pb) y carril 3: control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

Finalmente, se comparó la presencia de los genes que codifican para las proteínas Ses en cepas de (PS) e (IPA), y se encontró la mayor diferencia porcentual en los genes: *sesA* (83%), *sesB* (100%), *sesC* (92%), *sesE* (67%) y *sesH* (87%); los cuales se detectaron con mayor frecuencia en las cepas aisladas de (PS). Mientras que en las cepas de (IPA) solo se encontró diferencia en *sdrG* (Fbe) (80%), *sesF* (69%) y *sesI* (2%); ver **Figura 10**.

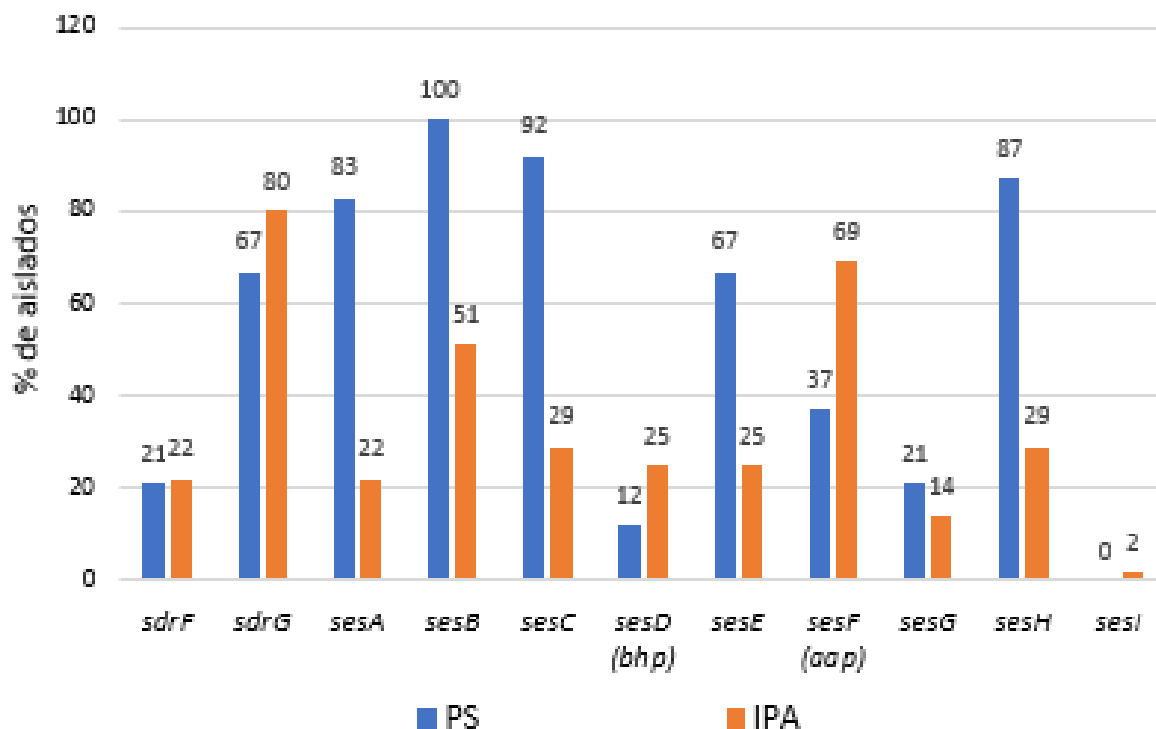


Figura 10. Porcentaje de presencia de los once genes que codifican para las proteínas Ses en las cepas de (PS) e (IPA). En color azul se representan a los aislados de (PS) y en color naranja a los aislados de (IPA).

En general, los resultados indican que existe diferencia entre los aislados (PS) e (IPA). Estas diferencias pueden tener una relevancia como indicativo del papel de algunos de estos genes en las infecciones producidas por *S. epidermidis*.

7. DISCUSIÓN

S. epidermidis es el mayor comensal de la piel y membranas en humanos. [8] Actualmente se ha convertido en un importante patógeno invasivo; asociado a infecciones nosocomiales y dispositivos médicos implantados, esto por su capacidad para adherirse a tejidos vivos o superficies inertes, y formar biopelículas. [5, 17] Se estima que es el responsable del 43% de las IPA alrededor del mundo. [59] En el presente estudio se analizaron fenotípicamente y molecularmente sus principales factores de virulencia (susceptibilidad antimicrobiana y biopelículas), además, determinamos la frecuencia de los genes *ses* en 75 cepas de *S. epidermidis* aisladas de dos diferentes nichos: piel sana (PS) e infección de prótesis articular.

La resistencia a los antimicrobianos, particularmente a las penicilinas como la oxacilina es la capacidad que han desarrollado las bacterias como *S. epidermidis*, para impedir que los antibióticos actúen contra ellos (OMS). El uso indiscriminado de los antibióticos, ha generado que más cepas presenten altos porcentajes de resistencia antimicrobiana, y como consecuencia los tratamientos convencionales sean ineficientes. Por ejemplo, un estudio publicado por Du *et al.* [14]; describen comparativamente el perfil de susceptibilidad antimicrobiana con aislados de *S. epidermidis* entre 2010 y 2011, en un hospital en China, y encontraron que un 38% (PS*) y 95% de (IC) eran resistentes a meticilina (SEMR), con sensibilidad a linezolid y vancomicina. En nuestro estudio, encontramos porcentajes de resistencia más bajos a la oxacilina, que pudiesen indicar una diferencia porcentual entre los aislados (PS) e (IPA), así como sensibilidad de las cepas a linezolid y vancomicina como antibióticos de última línea. Cherifi *et al.*[10]; en un estudio similar reportan

resistencia a penicilina de 88% (PS*) y 100% (IC), levofloxacin 24% (PS*) y 70% (IC), gentamicina 12% (PS*) y 50% (IC), y rifampicina 0% (PS*) y 5% (IC) también con sensibilidad a linezolid y vancomicina. En conclusión, el porcentaje de resistencia que nosotros encontramos para penicilina, fluoroquinolonas (levofloxacin y ciprofloxacina), gentamicina, y rifampicina (ver **Tabla 4 y Figura 1 anexa**) es semejante a los reportados por estos últimos autores (Du *et al.* y Cherifi *et al.*), reforzando así los datos encontrados en estas tesis, donde el perfil de resistencia es más alto en las cepas clínicas (IC) en comparación con las cepas comensales (PS*) (ver **Figura 1 anexa**), pudiendo ser un factor que aumente la virulencia de las cepas invasivas de *S. epidermidis* capaces de formar biopelículas. De forma general, las diferencias en el perfil de resistencia a los antibióticos entre los aislados de PS e IPA, se deben especialmente a la presión selectiva ejercida por el uso irracional de los antibióticos, que contribuye a la aparición de mecanismos de resistencia, por ejemplo: cepas *mecA*-positivas y la propagación de éstas (OMS). En este estudio, caracterizamos fenotípicamente las cepas formadoras de biopelícula, mediante un ensayo semicuantitativo *in vitro* de adhesión en microplaca con cristal violeta, descrito por Christensen *et al.* ^[11] (ver **Figura 6**); y los criterios de la biopelícula producida por Stepanović *et al.* ^[55] (ver **Tabla 2**). Encontramos el mayor porcentaje (45%) de cepas formadoras de biopelícula en los aislados de IPA, donde 20% son PD y 25% PF, comparado con el (25%) obtenido de las cepas de PS (8% PD y 17% PF, ver **Figura 7**). En un estudio publicado por Mateo *et al.* ^[32], analizaron comparativamente la formación de biopelícula *in vitro* en cepas aisladas de PS y de IC aisladas entre 2003 y 2004, reportando que 88.4% de las cepas de

IC producían biopelícula (44.2% PD y 44.2% PF), y 64.3% en las de PS (64.3% PD y 0% PF). Otro estudio similar por Arciola *et al.* [31], realizado únicamente con aislados de infección de prótesis asociadas a dispositivos médicos del Instituto Ortopédico Rizzoli en Italia, reportan 67% de cepas formadoras de biopelícula (15% PD y 52% PF). Los datos obtenidos en esta tesis son similares a los reportados por Mateo *et al.* y Arciola *et al.*, donde la diferencia en los porcentajes entre PD y PF se mantiene, aunque los valores netos son menores en nuestro caso, concluyendo que las cepas formadoras de biopelícula se encuentran más en el ámbito nosocomial (IC e IPA) y en menor proporción en cepas comensales (PS) aisladas fuera del ámbito hospitalario.

En el caso de las cepas NP, Mateo *et al.* [32] reportan 36% en PS y 11.5% en IC, y nosotros encontramos 75% en PS y 55% en las de IPA, esta diferencia entre IPA y PS es relevante ya que indica que hay un mayor número cepas NP en aislados de PS, comparadas con las de IPA, y que concuerdan con los reportados por Mateo *et al.* sólo que con porcentajes más altos.

Para concluir, el aporte más importante de esta tesis es la detección de los genes que codifican para once proteínas (Ses) presentes en *S. epidermidis* por la técnica de PCR. Estos genes, fueron identificados previamente en la cepa de referencia RP62A (ATCC 35984), por Bowden *et al.*, 2005; sin embargo su presencia en cepas aisladas de PS e IPA ha sido poco estudiada (ver **Tabla 5 y 6**). Uno de los genes más ampliamente estudiados es el gen *sesF* (*aap*), distribuido tanto en cepas comensales como en cepas aisladas de infección. [48] El gen *aap* promueve la unión primaria a superficies y la agregación celular durante la formación de la biopelícula.

[40, 53] En nuestro estudio, ver **Figura 10**, encontramos la presencia del gen *aap* en el 37% de las cepas PS y 69% en las de IPA, de las cuales 28.5% formaron biopelícula (12.5% PS y 16% IPA) respectivamente. Estos datos, son similares a los reportados por Hellmark *et al.* [25]; con un 71% en cepas de PS y 64% en las de IPA, solo que en las de PS nuestro porcentaje fue menor. Sin embargo, un estudio similar por Najjar-Peerayeh *et al.* [34]; en un hospital de Terán, Irán; reafirma los datos obtenidos para las cepas clínicas con un 64.4% de frecuencia de dicho gen. La alta prevalencia en aislados clínicos o IPA, podría estar implicada en la formación de biopelícula por el mecanismo independiente de PIA y ser relevante en aislados de IPA. [58]

Al igual que *aap*, el gen *sesD (bhp)* es importante para la adhesión y agregación celular de la biopelícula por el mecanismo independiente de PIA/PNAG. [34, 48] Nosotros encontramos este gen en 12% de las cepas PS y 25% en las IPA (ver **Figura 10**), estos datos son similares a los descritos por Rohde *et al.* [45], con presencia del gen *bhp* del 26.7% en PS y 18.8% en IC. Otro de los genes implicados en la adhesión intercelular y necesario para la unión de *S. epidermidis* a superficies recubiertas de fibrinógeno es el gen *sdrG (fbe)*, presente tanto en cepas comensales como en cepas clínicas. [45] Lo encontramos en un 67% de las cepas de PS y 80% en las IPA. Mekni *et al.* [33], reportan 92% en cepas comensales y 98% en cepas IC, estos porcentajes son parecidos a los obtenidos aquí, aunque nuestro porcentaje fue menor para las de PS. En un estudio similar Arciola *et al.* [2] en aislados de infección ortopédica de un hospital italiano, encontraron el 78% de dicho gen, ambos

estudios y nuestros resultados podrían indicar que su prevalencia es preferentemente alta en la forma invasiva. [58]

Uno de los genes que podrían ser un blanco potencial para el desarrollo de vacunas contra *S. epidermidis* es el gen *sdrF* que está presente tanto en cepas comensales como en cepas clínicas. [57, 58] En nuestro estudio lo encontramos en 22% de las cepas PS y 22% en las IPA, ver **Figura 10**, sin embargo Shahrooei *et al.* [58], describen 72% en cepas de PS y 88% en aislados clínicos. Estos porcentajes son más altos a los que nosotros encontramos, por lo que la prevalencia del gen en ambos nichos: PS e IPA, es importante para colonizar la superficie de la piel. [57]

Uno de los genes más conservados en *S. epidermidis*, es el gen *sesC*. [27] Nosotros lo detectamos en el 92% de cepas PS y en un 29% de las IPA, ver **Figura 10**, de las cuales 35% formaron biopelículas (10% y 25%), respectivamente. En un reporte por Van Mellaert *et al.* [58], encontraron 55% en PS y 86% en cepas clínicas. Estos porcentajes son invertidos a los que obtuvimos, haciéndolos controversiales en el papel de *sesC* en la formación de la biopelícula, ya que todavía no se ha definido su función en este ciclo. [27]

Finalmente, el gen *sesI* que codifica para la proteína *SesI*, es una de las proteínas actualmente descritas en la que se han encontrado altos títulos de anticuerpos en pacientes con cuadro de infección, indicando que su expresión es únicamente en los procesos infecciosos por *S. epidermidis*. [58] Nosotros encontramos la presencia del gen *sesI* en un 2% de las cepas IPA (ver **Figura 10**) y no lo detectamos en las cepas de PS, este porcentaje aunque es bajo es representativo, porque de acuerdo a reportes por Söderquist *et al.* [52], lo detectaron en 62% de las cepas IPA, pero no

hubo presencia en ninguna cepa de PS. El resto de los genes: *sesA*, *sesE*, *sesG* y *sesH*, están siendo investigados a fondo, en algunos casos como el gen *sesE*, se sugiere que podría participar en la agregación celular de la biopelícula, pero su función aún es desconocida. [24]

De manera general, las cepas comensales difieren de las cepas aisladas de infección por factores implicados en la adhesión y agregación celular de la biopelícula de acuerdo a un estudio publicado por Harris *et al.* [24], donde analizaron en cepas comensales y aislados de infección asociadas a dispositivos médicos, la presencia o ausencia de algunos genes *ses* como: *bhp*, *sdrF*, *sesC*, *sesE*, *sesG*, *sesH* y *sesI*. Estos autores plantean que la ausencia del operón *icaADBC* es más común en aislados de cepas comensales. [24] Esto podría tener implicación en la presencia o ausencia de estos genes en cepas aisladas de diferentes nichos como: (PS) o (IPA), porque nosotros observamos mayor porcentaje de presencia de los genes *ses* en las cepas comensales (PS), ver **Figura 10**, donde frecuentemente está ausente el operón *icaADBC*, y por tanto la adherencia y agregación celular durante formación de la biopelícula tendría que ser mediada por el mecanismo independiente de *icaADBC*, en el que están involucradas las adhesinas proteicas como: Aap, Bhp, Embp, AtlE, y los genes que codifican para las proteínas de superficie Ses.

Los resultados que se presentan en esta tesis tienen relevancia no sólo para el Instituto Nacional de Rehabilitación, sino que proporcionan información sobre los principales marcadores de virulencia de *S. epidermidis* durante la formación de biopelícula en dispositivos médicos tanto a nivel general, como para un centro de

referencia médico especializado en medicina de rehabilitación y ortopedia en el país.

8. CONCLUSIONES

Se encontró una gran prevalencia del gen *mecA* en aislados de infección de prótesis articular (IPA), así como una alta resistencia antimicrobiana principalmente a penicilinas y quinolonas.

Se observó mayor formación de biopelícula *in vitro* en las cepas IPA, en comparación con las cepas comensales (PS).

Encontramos mayor presencia de los genes *ses*, en las cepas comensales (PS), y en menor proporción en las cepas de infección de prótesis articular (IPA).

El gen *sesI*, no se detectó en cepas de PS, indicativo de que su presencia está solamente relacionada a aislados de infección de prótesis articular (IPA).

Los resultados obtenidos dan pie a conocer la prevalencia de los genes *ses* en cepas aisladas de diferentes nichos: PS e IPA, provenientes de pacientes del INR en México.

9. PERSPECTIVAS

Debido a que el principal factor de virulencia de *S. epidermidis* es la formación de biopelículas, éstas se han convertido en pieza clave para la búsqueda de “blancos” terapéuticos con la finalidad de evitar su establecimiento tras la colocación de un dispositivo médico. Un factor importante, es el avance en el estudio de los genes que codifican para las proteínas, la investigación de éstas proteínas contribuirá a conocer el papel que desempeñan tanto en aislados controles como en aislados de infección protésica, por medio de ensayos de expresión tanto en estado libre como en biopelículas; permitiendo así el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas, que puedan inducir una respuesta inmune protectora antes de la colocación de un dispositivo o frente a las biopelículas ya formadas. Así como la implementación de otras alternativas de inmunización con el uso de anticuerpos monoclonales para su total prevención.

10. REFERENCIAS

- [1] Archer G. L., & Niemeyer D. M. (1994) Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends. Microbiol.* 2(10):343-7.
- [2] Arciola C. R., Campoccia D., Gamberini S., Donati M. E. & Montanaro L. (2004) Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. *Biomaterials.* 25(19):4825-9.
- [3] Arciola C. R., et al. Montanaro L. (2006) Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 76(2):425-30.
- [4] Arora S., Uhlemann A. C., Lowy F. D., & Hook M. (2016) A novel MSCRAMM Subfamily in Coagulase Negative Staphylococcal Species. *Front. Microbiol.* 7(540): 1-9.
- [5] Becker K., Heilmann C., & Peters, G. (2014) Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27(4):870-926.
- [6] Boquete-Blanco M. T. (1996) Aplicación de marcadores epidemiológicos en la evaluación microbiológica de aislamientos de *Staphylococcus sp.* coagulasa negativos en hemocultivos. [Tesis doctoral] Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. Pág: 4-6. Asesor: Juan Antonio Sáez Nieto.
- [7] Bowden M. G., et al. Höök M. (2005) Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 151 (Pt 5):1453–64.
- [8] Büttner H., Mack D., & Rohde H. (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5(14):1-15.
- [9] Castrillón-Rivera L. E., Palma-Ramos A., & Padilla-Desgarenes, M. C. (2010). Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev. Mex.* 54(1):14-24. [en línea] [citado 2017-09-05]. Recuperado: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2010/rmd101d.pdf>.
- [10] Cherifi S., et al. Hallin M. (2014) Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bloodstream infection and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13:20.

- [11] Christensen G. D., et al. Beachey E. H. (1985) Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22(6): 996-1006.
- [12] Contreras J. J., & Sepúlveda M. (2014) Bases moleculares de la infección asociada a implantes ortopédicos. *Revista chilena de infectología.* 31(3):309-322. [en línea] [citado 2017-04-06]. Recuperado: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000300010>.
- [13] Coates R., Moran J., & Horsburgh M. J. (2014) Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future. Microbiol.* 9(1):75–91.
- [14] Du X., et al. Li M. (2013) Molecular Analysis of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Community and Hospital Environments in China. *PLoS One.* 8(5): e62742.
- [15] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., & Stackebrandt E. (2006). *The Prokaryotes: A handbook on the Biology of Bacteria.* Volumen 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. (3ra ed.) Springer Science+Business Media, LLC. Pág 53. ISBN-10: 0-387-25494-3.
- [16] Echevarria-Zarate J., & Iglesias-Quilca D. (2003) Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Herediana.* 14(4):195-203. [en línea] [citado 2017-10-03]. Recuperado: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000400008&lng=es&nrm=iso. ISSN 1729-214X.
- [17] Fariña N., et al. de Kaspar H. (2013) *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de infectología,* 30(5):480-488. [en línea] [citado 2017-03-05]. Recuperado: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>.
- [18] Fey P. D., & Olson M. D. (2010) Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future. Microbiol.* 5 (6): 917-933.
- [19] Foster T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(1): 49-62.
- [20] Galicia-Camacho A. N. (2010) Detección fenotípica de formación de biofilms en cepas de *Staphylococcus epidermidis* obtenidas de pacientes hospitalizados con infecciones nosocomiales. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Pág: 14. Asesor: Roberto Contreras Cabrera.
- [21] Gill S. R., et al. Fraser C. M. (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant

Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J. Bacteriol. 187(7):2426–38.

[22] Gomes F., Teixeira P., & Oliveria R. (2013) Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. Biofouling. 30(2):131-41.

[23] Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y tratamiento de las Infecciones Asociadas a Dispositivos Ortopédicos Prótesis y/o material de osteosíntesis. México: Secretaría de Salud, 2013.

[24] Harris L. G., et al. Sheppard S. K. (2016) Biofilm Morphotypes and Population Structure among *Staphylococcus epidermidis* from Commensal and Clinical Samples. PLoS One. 11(3):e0151240.

[25] Hellmark B., Söderquist B., Unemo M., & Nilsson-Augustinsson Å. (2013) 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(1):32-9.

[26] Jiménez-Quiceno J. N., & Correa-Ochoa M. M. (2009) *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. 22(2): 147-158. [en línea] [citado 2017-03-29]. Recuperado:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180513869006>> ISSN 0121-0793.

[27] Khodaparast L., et al. Van-Eldere J. (2016) The Possible Role of *Staphylococcus epidermidis* LPxTG Surface Protein SesC in Biofilm Formation. PLoS One. 11(1): e0146704.

[28] Lasa I., del Pozo J., Penadés J., & Leiva J. (2005) Biofilms bacterianos e infección. Anales del sistema sanitario de Navarra. 28 (2):163-175. [en línea] [citado 2017-05-18]. Recuperado: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272005000300002&lng=es&tlng=es.

[29] Leveaux D., Ghigo J. M., & Beloin, C. (2014) Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbio.l Mol. Biol. Rev. 78(3):510-43.

[30] Llop-Hernández A., Valdés-Dapena V. M., & Zuazo-Silva. (2001). Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo I. Editorial [PDF file]. La Habana. Ciencias Médicas. Pág 152-158. ISBN 959-7132-52-4.

[31] Louie L., Goodfellow J., Mathieu P., Glatt A., Louie M., & Simor A. E. (2002) Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. 40(8): 2786-90.

- [32] Mateo M., et al. Prieto J. (2008) Strong slime production is a marker of clinical significance in *Staphylococcus epidermidis* isolated from intravascular catheters. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27(4):311-4.
- [33] Mekni, M. A., Bouchami O., Achour W., & Ben-Hassen A. (2012) Strong biofilm production but not adhesion virulence factors can discriminate between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. APMIS. 120(8):605-11
- [34] Najjar-Peerayeh S., Jazayeri-Moghadas A., & Behmanesh M. (2016) Prevalence of Virulence-Related Determinants in Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Jundishapur. J. Microbiol. 9(8):e30593.
- [35] Nazar J. (2007) Biofilms bacterianos. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 67(1):161-172 [en línea] [citado 2017-04-07]. Recuperado: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>.
- [36] Oromí J. (2000) Resistencia bacteriana a los antibióticos. Medicina Integral. 36(10):367-370 [en línea] [citado 2017-04-08]. Recuperado: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-10022180>.
- [37] Ortega-Peña S., & Franco-Cendejas R. (2014) Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. Investigación en discapacidad. 3(3):106-113.
- [38] Otto M. (2009) *Staphylococcus epidermidis*: the “accidental” pathogen. Nat. Rev. Microbiol. 7(8):555-567.
- [39] Otto M. (2012) Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin. Immunopathol. 34(2): 201–214.
- [40] Paharik A. E., & Horswill A. R. (2016) The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. Microbiol. Spectr. 4(2):1-48.
- [41] Predari S. C. (2007) Estafilococos coagulasa negativos: el enemigo silente. Revista argentina de microbiología. 39(1):1-3 [en línea] [citado 2017-02-27]. Recuperado: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000100001&lng=es&tlng=es.
- [42] Qin L., McCausland J. W., Cheung, G. Y. C., & Otto M. (2016) PSM-Mec-A Virulence Determinant that Connects Transcriptional Regulation, Virulence, and Antibiotic Resistance in Staphylococci. Front. Microbiol. 7:1293.
- [43] Quispe P. G. D., & Castillo L. H. (2014) Cocos Gram Positivos. Rev. Act. Clin. Med. 49:2603-2608. [en línea]. [citado 2017-02-27]. Recuperado:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000004&lng=es.

[44] Ribeiro M., Monteiro F. J., & Ferraz M. P. (2012) Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter*. 2(4):176-94.

[45] Rohde H., et al. Mack D. (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5614–9.

[46] Rohde H., et al. Mack D. (2007) Polysaccharide intercellular adhesion or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip knee joint infections. *Biomaterials*. 28:1711-1720.

[47] Rolo J., et al. Miragaia M. (2017) Evidence for the evolutionary steps leading to mecA-mediated β -lactam resistance in staphylococci. *PLoS Genet.* 13(4):e1006674.

[48] Sabaté-Brescó M. et al. Moriarty T. F (2017) Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Front. Microbiol.* 8:1401.

[49] Schneewind O., & Missiakas D. (2014) Sec-Secretion and Sortase-Mediated Anchoring of Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1843(8):1687-1697.

[50] Shahrooei M., et al Van-Eldere J. (2012) Vaccination with SesC Decreases *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 80(10):3660-8.

[51] Shapiro J. A., Nguyen V. L., & Chamberlain N. R. (2011) Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J. Med. Microbiol.* 60(Pt 7):950-60.

[52] Söderquist B., et al. Jacobsson S. (2009) *Staphylococcus epidermidis* surface protein I (SesI): a marker of the invasive capacity of *S. epidermidis*? *J. Med. Microbiol.* 58(Pt 10):1395-7.

[53] Speziale P., Pietrocola G., Foster T., & Geoghegan J. (2014) Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 171(4): 1-10.

[54] Stapleton P. D., & Taylor P. W (2002) Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci. Prog.* 85(1): 57-72.

- [55] Stepanović S., & Ruzicka F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*. 115(8):891-899.
- [56] Srivastava S., & Bhargava A. (2016) Biofilms and human health. *Biotechnol. Lett.* 38(1):1-22.
- [57] Trivedi S., et al. Lowy F. D. (2017) The Surface Protein SdrF Mediates *Staphylococcus epidermidis* adherence to keratin. *J. Infect. Dis.* 215(12):1846-1854.
- [58] Van Mellaert L., Shahrooei M., Hofmans D., & Eldere V. J. (2012) Immunoprophylaxis and immunotherapy of *Staphylococcus epidermidis* infections: challenges and prospects. *Expert. Rev. Vaccines*. 11(3): 319-334.
- [59] Valour F, et al. Frédéric L. (2013) *Staphylococcus epidermidis* in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation. *PLoS One*. 8(6): e67240.
- [60] Vila J., Soriano A., & Mensa J. (2008) 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(1):48-55.
- [61] Wielders C. L. et al. Fluit A. C. (2001) *In-vivo* transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357:1674-1675.
- [62] Winn (h.) W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schereckenberg P., & Woods, G. (2008) *Koneman Diagnostico microbiológico texto y atlas en color*. (6ta ed). Editorial médica panamericana. Pág 595-610. ISBN: 978-950-06-0895-4.
- [63] Yang, Y., Zhang X., Huang W., & Yin, Y. (2016) SCCmec-associated *psm-mec* mRNA promotes *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 109(10):1403-15.

Anexo. Figura 1

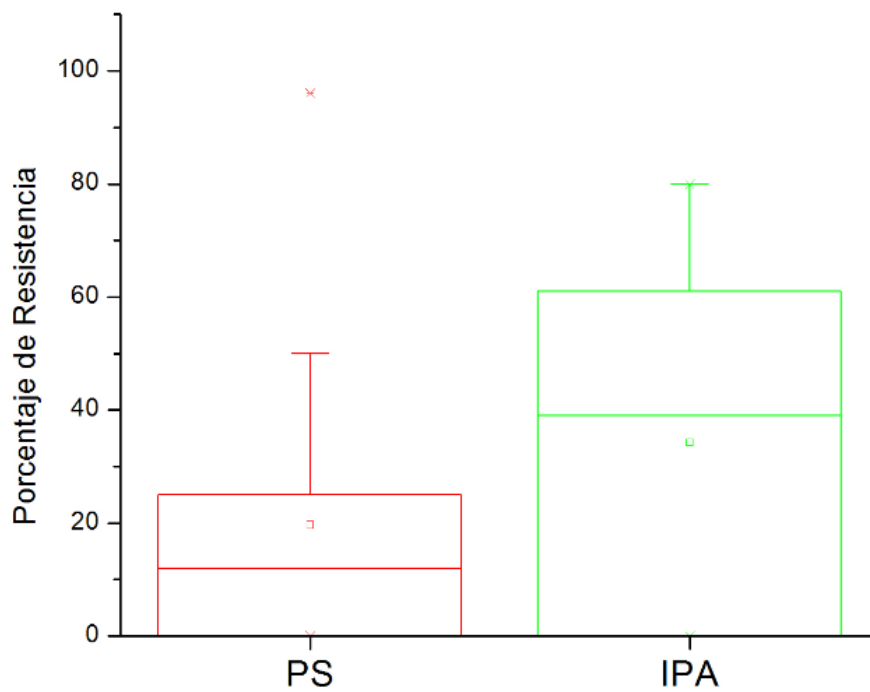


Figura 1. Gráfico tendencial de la resistencia antimicrobiana entre las cepas de PS e IPA. En color rojo se muestran los aislados de (PS) y en color verde a los aislados de IPA.