



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Producción de biofilm de *Staphylococcus aureus* en
aislados de niños mexicanos con dermatitis atópica del
Instituto Nacional de Pediatría”**

TESIS

Que para obtener el título de:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A
DIANA ANDREA CHAPARRO CAMACHO

ASESOR: Dra. CAROLINA MARIA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ

CO-ASESOR: M.C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO; 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**



VOTO APROBATORIO

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN ALDERRAMA BRAVO

**Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Producción de biofilm de Staphylococcus aureus en aislados de niños mexicanos con dermatitis atópica del Instituto Nacional de Pediatría.

Que presenta la pasante: **Diana Andrea Chaparro Camacho**

Con número de cuenta: **313244377** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Marzo de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

“Todos somos unos genios. Pero si juzgas a un pez por su habilidad de escalar un árbol, vivirá su vida entera creyendo que es inútil.”

— Albert Einstein



Dedicatorias

Que la siguiente página sirva para mostrarles mi gratitud y cariño a todas las personas importantes en mi vida que contribuyeron para concluir esta etapa.

Comenzaré con mis papás, mi base, ellos que han hecho todo por verme feliz, muchas gracias por su apoyo y amor, gracias, por tanto. Sepan que esto es de ustedes, porque sin ustedes nada.

Mis hermanos, Mariela y Alejandro por estar para mí, escucharme, amarme y acompañarme en cada día, fuera bueno o malo.

Mis profesores Andrea, Don Martin, Francisco, Jonathan, mis ejemplos académicamente, y de vida, agradecida eternamente, porque cuando no sabía lo que podía dar de mí, ustedes me demostraron lo talentoso que puede llegar a ser una persona.

Mis amigos Samara, Itzel, Alejandra, Mariana, Emiliano, Armando, Atonatiuh, Josué, Araceli, por compartir grandes momentos conmigo dentro y fuera de las aulas, por contribuir en mi vida y hacerme tan feliz.

Finalmente, que esta página sea un recordatorio para mí, siempre que vea este proyecto comprenda que cuando uno quiere algo lo puede cumplir, así pase mucho tiempo y que todas las emociones vividas, el esfuerzo y el dinero invertido valieron la pena.

Que sea el principio de muchas cosas legendarias.



Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por abrirme sus puertas, y regalarme una de las mejores etapas de mi vida.

Al Instituto Nacional de Pediatría y al Laboratorio de Bacteriología Experimental, por permitirme realizar mi trabajo de tesis, y conocer personas extraordinarias.

A mis Asesoras, la Doctora Carolina María Antonieta Romo González y la Maestra Andrea Angela Becerril Osnaya, por proporcionarme todas las herramientas, consejos y total apoyo para realizar este trabajo. Muchas gracias.

A la Doctora María Teresa García Romero, Investigador Responsable del proyecto Patrones de susceptibilidad antimicrobiana y producción de biofilm de *Staphylococcus aureus* en niños mexicanos con dermatitis atópica, por proporcionar las cepas identificadas para la realización de este proyecto de tesis.

Al Doctor Juan Carlos Cancino Diaz Profesor Titular TC SNI: Nivel II, del Departamento de Microbiología, del Instituto nacional politécnico, por el apoyo en el préstamo de las cepas control para la realización de este proyecto de tesis.

A la doctora Adriana Reyes León, investigadora del laboratorio de genética y cáncer por su apoyo en proporcionar el equipo EPOCH utilizado en la metodología de este proyecto.





ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	8
ABREVIATURAS	¡Error! Marcador no definido.
MARCO TEORICO	9
Dermatitis atópica, definición, prevalencia	9
Etiopatogenia de la dermatitis atópica	10
Factores genéticos	10
Factores inmunológicos.....	11
Disbiosis en el microbioma	11
<i>Staphylococcus aureus</i> en Dermatitis atópica	15
Biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Composición y estructura del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Matriz extracelular. -.....	19
Proteínas. -	23
DNA extracelular.-	24
Control genético del metabolismo del biofilm	25
Desarrollo del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Adherencia del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> .-	33
Multiplicación del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> . -	34



Éxodo del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> . -	36
Maduración del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Dispersión del biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> . -	38
JUSTIFICACIÓN	39
OBJETIVO	40
METODOLOGÍA	41
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	59
ANEXOS	60
ANEXO 1 REACTIVOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE CRISTAL VIOLETA.....	61
ANEXO 2 UTILIZACION DEL SOFTWARE Gen 5 Y EQUIPO EPOCH	62
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Fases clínico-evolutivas de la DA.....	9
Fig 2 Factores que caracterizan la etiopatogenia de la dermatitis atópica.....	10
Fig 3 Disbiosis en piel con dermatitis atópica.....	12
Fig 4 Distribución topográfica de bacterias en zonas cutáneas.....	13
Fig 5 Terapia antimicrobiana contra <i>S. aureus</i>	17
Fig 6 Esquema de la composición del biofilm de <i>S. aureus</i>	19
<i>Fig 7 Estructura del PIA</i>	21
<i>Fig 8 Formación de PIA</i>	22
<i>Fig 9 eDNA y formación de biofilm</i>	25
<i>Fig 10 agr</i>	28
<i>Fig 11 Regulación agr/sarA/sigB</i>	30
Fig 12 Descripción de las 5 etapas de desarrollo del biofilm de <i>S. aureus</i>	32
Fig 13 Modelo de interacciones celulares durante la etapa de multiplicación del desarrollo del biofilm.....	36
Fig 14 Plantilla de microplaca para ensayo de biofilm de <i>S. aureus</i>	43
Fig. 15 Producción de biofilm por aislado, zona y visita del paciente 4.....	48
Fig. 16 Producción de biofilm por aislado, zona y visita del paciente 9.....	49
Fig 17 Producción de biofilm por aislado, zona y visita de paciente 26.....	50
Fig. 18 producción de biofilm por aislado, zona y visita del paciente 16.....	51



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparación de la caracterización de la piel entre piel normal y con DA	14
<i>Tabla 2</i> Genes involucrados en la formación de biofilm de <i>S. aureus</i>	31
Tabla 3 Función de las proteínas CWA.....	35
Tabla 4 Características de los pacientes trabajados.....	41
Tabla 5 Resultados de producción de biofilm.....	45



ÍNDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1 GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE AISLADOS DE <i>S. aureus</i> , DE PIEL DE NIÑOS CON DA	46
GRAFICA 1 GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE AISLADOS DE <i>S. aureus</i> , DE PIEL DE NIÑOS CON DA	46
GRAFICA 2 GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE AISLADOS DE <i>S. aureus</i> , DE ACUERDO CON LA ZONA AISLADA EN LA PIEL DE NIÑOS CON DA	47
GRAFICA 3 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 9	52
GRAFICA 4 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 9	52
GRAFICA 5 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 26	53
GRAFICA 6 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 16	53

ABREVIATURAS

Agr. Regulador de genes accesorios

AIP. péptidos autoinductores

Atl. Autolisina

AMP. Péptidos antimicrobianos

CoNS. Coagulasa negativos

CWA. Proteínas ancladas a la pared

DA. Dermatitis atópica

ECM. Matriz extracelular

eDNA. DNA extracelular

EPS. Exopolisacáridos

FLG. Proteína Filagrina

FnBP. *Proteínas de unión a la fibronectina*

GAPDH. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

IL. Interleucina

INP. Instituto nacional de pediatría

MRSA. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MSCRAMM. Los componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva

MSSA. *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina

nuc. Termonucleasa

OD. Densidad óptica

ODcut. Densidad óptica de corte

PIA. Adhesina intercelular de polisacáridos

PNAG. N-acetil-glucosamina polimérica

PSM. Modulinas soluble al fenol

QS. Quorum sensing

sarA. Regulador accesorio estafilocócico

S. aureus. Staphylococcus aureus

SdrC. Proteína repetida de serina-aspartato

SpA. Proteína A

sigB. Factor sigma

Th. T-helper

INTRODUCCIÓN

Las bacterias pueden existir bajo dos formas de vida, la vida libre también conocida como planctónica y formando biofilm, esta última representa una antigua estrategia de supervivencia procariota, donde las bacterias logran ventajas significativas de protección frente a fluctuaciones medio ambientales de humedad, temperatura, pH, concentración de nutrientes, respuesta inmune del hospedero, tolerancia a los antimicrobianos (Nazar, 2015).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), es una bacteria Gram positiva, considerada patógeno por su gran potencial para causar infecciones, debido a su amplio contenido de factores de virulencia entre los que se encuentra la capacidad de producir biofilm (Paharik y Horswill, 2016). La producción de biofilm *in vivo* hace a las cepas altamente resistente conduciendo a enfermedades crónicas.

En pacientes con dermatitis atópica (DA) la infección por este patógeno representa uno de los principales problemas al que se enfrenta la práctica clínica, las lesiones cutáneas, y los patrones desregulados de respuesta inmunológica, permiten la susceptibilidad en comparación con la población pediátrica normal, provocando infecciones crónicas y recalcitrantes, asociadas a fenotipos de la enfermedad más severos, repercutiendo en la salud del paciente y su calidad de vida (Pérez, 2014).

La colonización por *S. aureus* puede estar asociada a la producción de biofilm debido a la resistencia inducida, provocando el fracaso de tratamientos antimicrobianos y de la propia respuesta inmune del hospedero, culminando en la exacerbación y perpetuación del curso de la dermatitis atópica. Teniendo así una triada epidemiológica completa, protagonizada por un hospedero susceptible y un patógeno oportunista (Blicharz, 2019).

MARCO TEORICO

Dermatitis atópica, definición, prevalencia.

La DA es una enfermedad alérgica crónica de la piel común y recurrente, donde se pasa repetidamente por las etapas: exacerbación y mejoría (Escarrer,2019). Se manifiesta con hallazgos característicos de piel seca, roja y pruriginosa en una distribución típica (figura 1), (Williams, 2015). Esta enfermedad se desarrolla en la infancia temprana, aparece en un 90% de los casos en los primeros años de vida, por lo cual se considera la enfermedad dermatología pediátrica más común (Jihyun, 2019).

	Edad	Lesiones	Localización	
Lactante	0-2 años	Eccema exudativo	Mejillas, cuero cabelludo, zonas de extensión de extremidades	
Infantil	2-12 años	Eccema subagudo	Flexura cubital y poplítea, zona periorbitaria y peribucal, dorso de manos	
Adolescente	>12 años	Eccema crónico Liquenificación	Flexuras, cuello, dorso de manos y pies	

Fig 1. Fases clínico-evolutivas de la DA. (Escarrer, 2019)

Aunque la DA rara vez es letal, es una enfermedad cutánea inflamatoria común asociada con una carga médica significativa, afecta del 15% al 20% de los niños en todo el mundo (Nakatsuji, 2018). En una revisión realizada por Silverbeng y colaboradores reportan una prevalencia en México en niños de 6 meses a de 6 años del 12.9%. A menudo la DA se liga con otras enfermedades alérgicas como el asma y rinitis alérgica, junto con estas se constituye la llamada “triada atópica” lo que agrava aún más la importancia de esta enfermedad (Escarrer,2019).

En los países industrializados la incidencia de la DA ha aumentado entre 2 y 3 veces durante las últimas tres décadas (Escarrer,2019). Esta situación podría ser causada por la llamada “HIPÓTESIS DE LA HIGIENE” se ha visto en México quienes viven en áreas rurales tienen una prevalencia más baja de padecer dermatitis atópica en relación con los que viven entornos urbanos o suburbanos (Silverbeng,2021).

Etiopatogenia de la dermatitis atópica

Los mecanismos exactos de la patogenia de la enfermedad siguen sin estar claros, es evidente tanto la disfunción de la barrera cutánea como la desregulación inmunitaria causadas por factores genéticos, inmunológicos y disbiosis microbiana, son etiologías críticas de la patología de la DA (Yang, 2020).

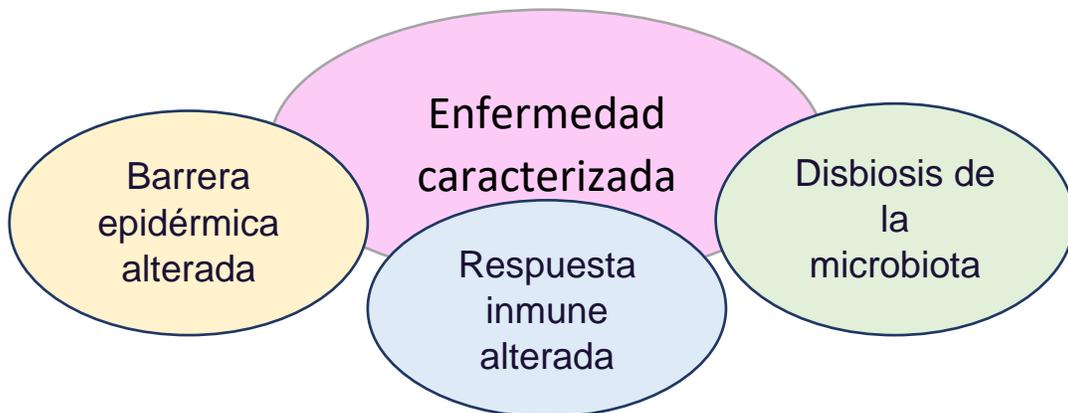


Fig 2 Factores que caracterizan la etiopatogenia de la dermatitis atópica

Factores genéticos

Existen mutaciones en determinados genes que alteran la barrera cutánea y producen una inflamación persistente. El factor genético más estudiado es la mutación en la Filagrina (FLG) (Kaufman, 2018). El déficit de FLG tiene una importante repercusión en la barrera epidérmica (tabla 1) (Armengot, 2015).

Los polimorfismos de varios genes de **vías inmunitarias** se asocian con un mayor riesgo de DA a través de alteraciones en la vía de señalización de tipo 2 de T-helper (Th). La regulación al alza de la interleucina (IL) 4 e IL-13 reduce la expresión de FLG (Kim, 2019).

Factores inmunológicos

Los factores inmunológicos incluyen citocinas inmunes de tipo 2, IL-4 e IL-13, desempeñan funciones importantes en la producción de quimiocinas, la disfunción de la barrera cutánea, la supresión de péptidos antimicrobianos (AMP) y la inflamación alérgica. En los pacientes con dermatitis atópica se mantiene una inflamación persistente de la dermis debido a la activación de los linfocitos T bifásica, con infiltrado inflamatorio inicialmente de predominio TH2 y de forma tardía TH1 (Mateos, 2011).

Los AMP, incluida la catelicidina y las β -defensinas humanas, son producidos por los queratinocitos y desempeñan un papel fundamental en la defensa del hospedero, así como en el control de las funciones fisiológicas, como la inflamación y la cicatrización de heridas. En los pacientes con DA existe una baja de estos AMP. Las expresiones de AMP son inhibidas por las citocinas Th2, que se producen de una manera desmedida (Kim, 2019) y por la disbiosis en el microbioma.

Disbiosis en el microbioma

La piel es la barrera externa más grande del cuerpo humano, es una defensa física y química que protege contra patógenos. Este tejido está en equilibrio dinámico y mantiene una relación simbiótica con un ecosistema de microorganismos denominado microbioma cutáneo (Ruiz, 2020).

La piel con DA ha disminuido la diversidad bacteriana asociada con el aumento de *Staphylococcus* y con la reducción de *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium* durante los brotes de DA (Kim, 2019).

La relación estudiada del microbioma de los pacientes con dermatitis atópica es la de los Coagulasa negativos (CoNS) y *S. aureus*, debido a la competencia entre estos por los mismos nichos ecológicos. Los CoNS estimulan la producción de AMP por parte de los queratinocitos, sin embargo, en los pacientes con DA esta estimulación se ve reducida al haber una disminución de los CoNS, por un predominio de *S. aureus*, en la población del microbioma cutáneo.

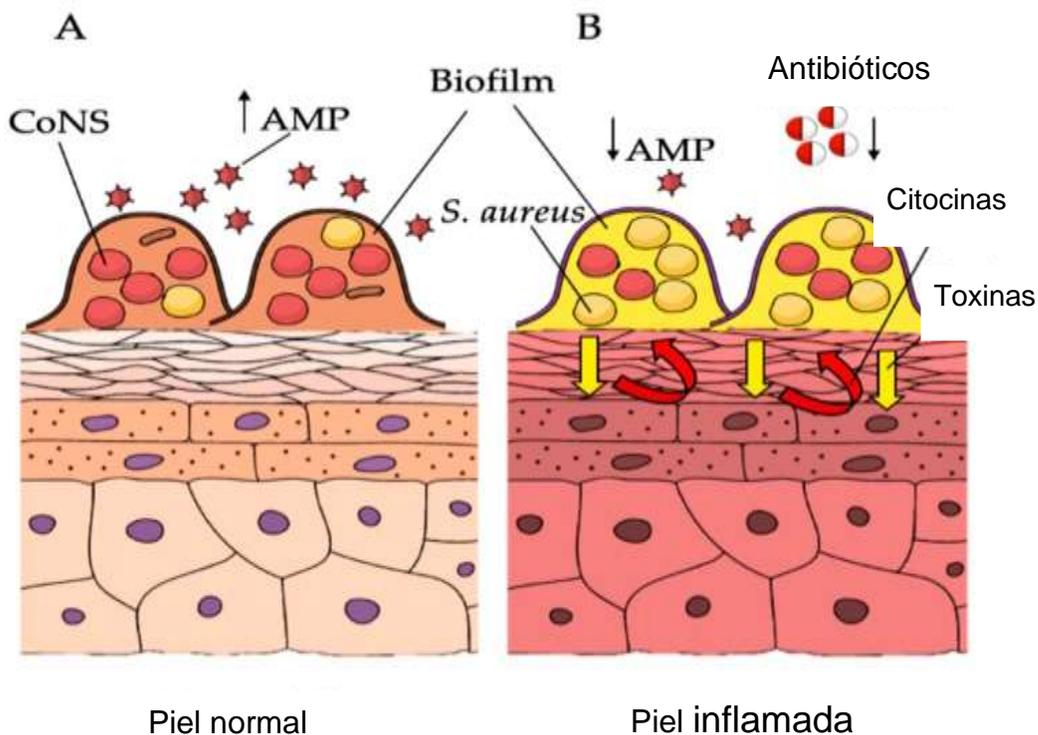


Fig 3 Disbiosis en piel con dermatitis atópica. A. Se muestra una barrera epitelial confluyente donde los CoNs están en mayor proporción que *S. aureus*, la relación microbiota- hospedero esta equilibrada y existe la correcta producción de AMPs. B. En el caso de un paciente con DA la barrera epitelial se encuentra inflamada, *S. aureus* domina la población microbiana en la piel, y la población de CoNs disminuye, el equilibrio del microbioma de rompe y se genera la reducción de AMPs, la presencia de las toxinas excretadas por *S. aureus* sobre estimula la producción de citocinas que perpetúan el estado de inflamación de la piel y a su vez la respuesta inmune reduce la producción de AMPs (Domenico, 2019).

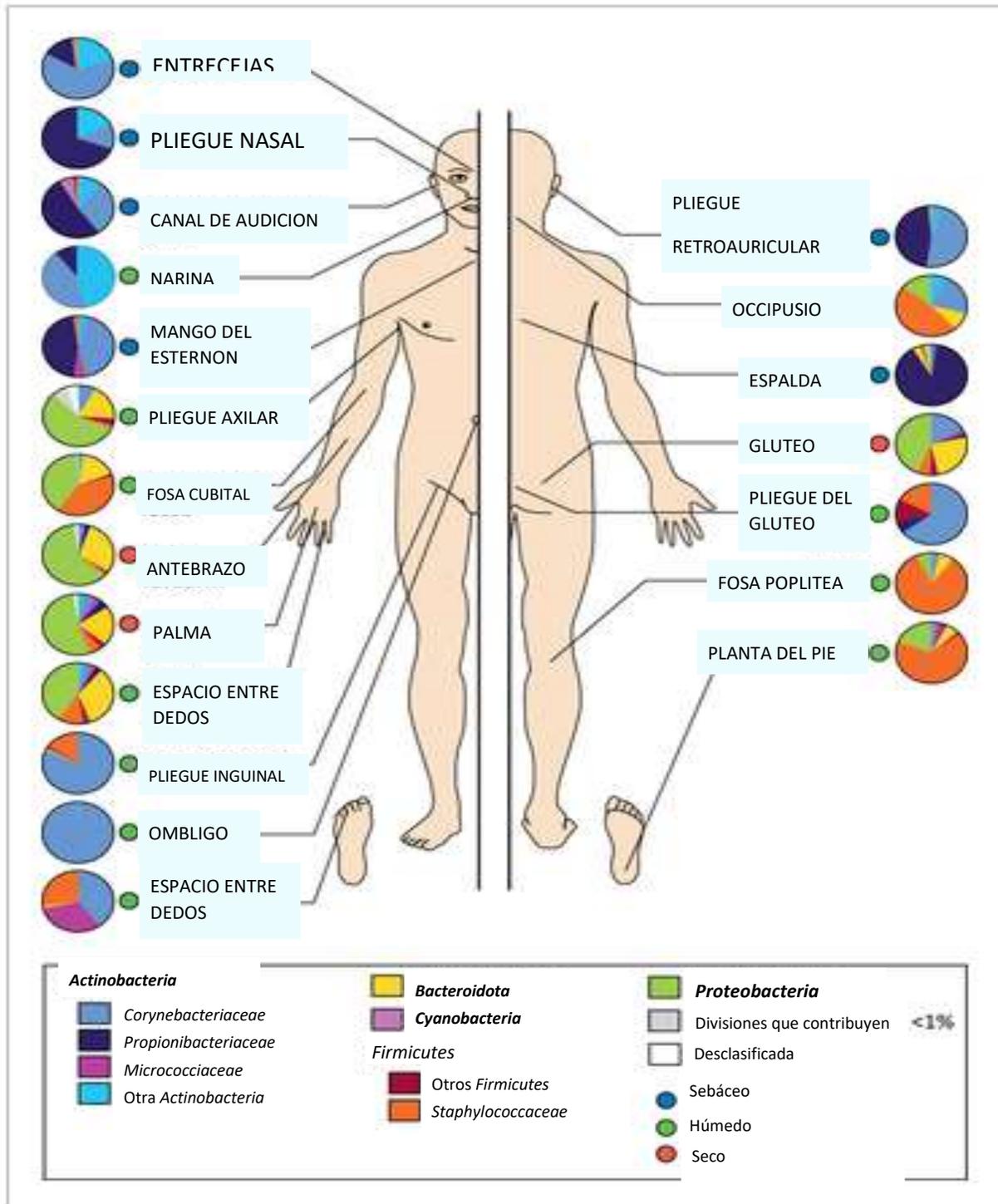


Fig 4 Distribución topográfica de bacterias en zonas cutáneas. Se muestra la clasificación a nivel familiar de las bacterias que colonizan un sujeto, con los filis en negrita. Los sitios seleccionados fueron aquellos que muestran predilección por las infecciones bacterianas de la piel y se agruparon en sebáceas o grasas (círculos azules), húmedos (típicamente pliegues cutáneos) (círculos verdes) y superficies secas y planas (círculos rojos) (Powers, 2015)

Tabla 1 Comparación de la caracterización de la piel entre piel normal y con DA

	Piel normal	Piel con dermatitis atópica
Microbioma cutáneo	<ul style="list-style-type: none"> • Colonizado por CoNS-AMP • Alta diversidad • Alta prevalencia de antimicrobianos y antiinflamatorios de <i>CoNS</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Menos colonizado por CoNS-AMP • Baja diversidad • Incremento de la colonización por <i>S. aureus</i> • Alta prevalencia de factores de virulencia de <i>S. aureus</i>, como PSMa
Protección por AMPs	<ul style="list-style-type: none"> • Inducible en lesiones o estímulos bacterianos 	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción inhibida por citocinas Th2 • Insuficiente para suprimir <i>S. aureus</i> • Degradado por autolisina de <i>S. aureus</i>
Sistema inmunológico	<ul style="list-style-type: none"> • Sin inflamación • Potencial inmune innato óptimo 	Proinflamatorio Predominante de Th2 Potencial inmune innato suprimido
pH	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcalino /neutro
Función barrera	<ul style="list-style-type: none"> • Fuerte • Entrada regulada de microbios comensales • Evaporación baja de agua 	<ul style="list-style-type: none"> • Defectos genéticos en la barrera del hospedero • Entrada mejorada de microbios y alérgenos • Alta evaporación de agua • <i>S. aureus</i> exacerba el daño de la barrera • Rotura mecánica por rascado

***Staphylococcus aureus* en Dermatitis atópica**

La piel de los pacientes con DA es una barrera debilitada, con respuesta inmune desregulada, es un blanco fácil para la penetración de patógenos oportunistas como *S. aureus*. *S. aureus* coloniza la piel en el 60-100% de los pacientes con DA en comparación con el 5-30% de los controles sanos (De Benedetto, 2009).

La mayoría de los pacientes con DA, se enfrentan a infecciones recurrentes por parte de esta bacteria, que perpetua la inflamación en la piel y a su vez agrava el fenotipo de la enfermedad, pacientes que presentan zonas con lesiones o un puntaje de SCORARD alto, cursan una infección con *S. aureus* respecto de pacientes que no presentan lesión o bajo puntaje en SCORARD, afectando en gran medida la calidad de la vida del paciente y su cuidador (Franco, 2010).

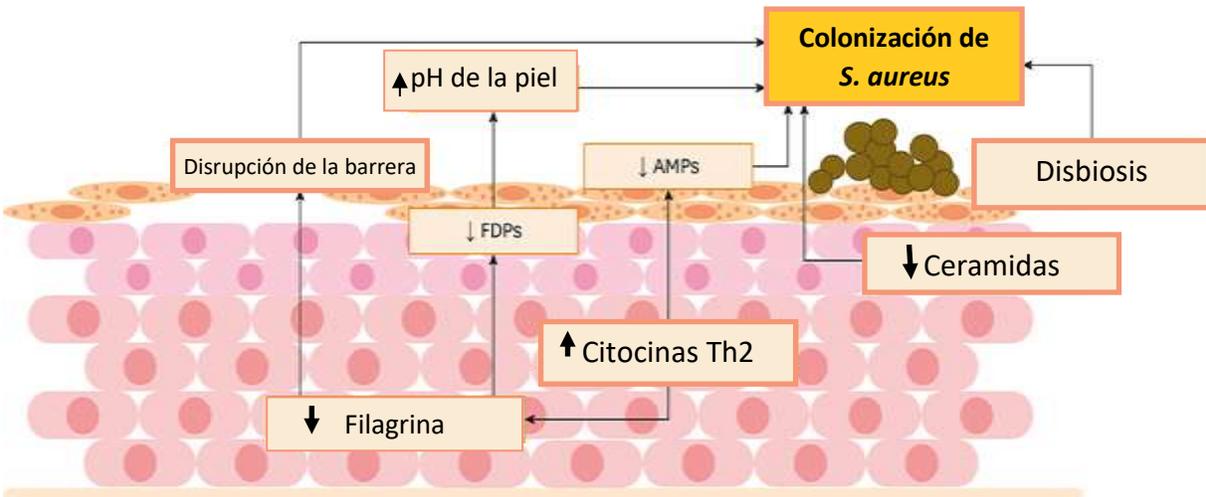


Fig 5 Colonización por *Staphylococcus aureus* en la piel de la DA. La disfunción de la barrera cutánea, la deficiencia de AMP y la disminución de los niveles de Filagrina y FDP, el pH alterado de la piel, la sobreexpresión de citoquinas Th2, la disbiosis microbiana y los perfiles de lípidos alterados, facilitan la colonización de *S. aureus* en la piel con DA. DA, dermatitis atópica; FDP, producto de degradación de la filagrina; AMP, péptido antimicrobiano (Kim,2019).

S. aureus cuenta con factores de virulencia para causar daño, incluidos toxinas, enzimas y otras proteínas, contribuye a cerrar un círculo beneficioso para esta bacteria propiciando un aumento la inflamación y la disfunción de la barrera cutánea que se mantenían en la DA, justificando el agravamiento del cuadro clínico de los pacientes (Kim, 2019).

S. aureus productor de biofilm desempeña un papel fundamental en la exacerbación de la DA. El biofilm de *S. aureus* crece rápidamente en la epidermis, induciendo hipoxia y daños en la barrera epidérmica protectora (Gonzalez, 2017).

Algo que causa alarma en la clínica es el alta recalcitrancia por parte de la colonización de *S. aureus* en pacientes con dermatitis, y la no respuesta al tratamiento que provoca la perpetuación de la infección en los pacientes y retrasa la resolución de la DA (Di Domenico, 2019).

La tolerancia a un antimicrobiano puede estar mediada por un fenotipo latente causado por la adaptación a un ambiente anoxico y privación de nutrientes, dentro del biofilm, dando como resultado niveles metabólicos y tasas de división celular baja. Es importante indicar dentro del biofilm pueden existir bacterias que posean genes de resistencia contra antimicrobianos específicos, pero el biofilm es un factor de patogenicidad confiere protección y supervivencia, no resistencia a antibióticos, su participación en este aspecto es la formación de tolerancia, que puede ser física si se ve al biofilm como una barrera protectora, en la cual los antimicrobianos no pueden diseminar hasta el fondo, o por el estado metabólicamente inactivo que adoptan algunas colonias dentro del biofilm, que impide que el antibiótico golpee su objetivo microbiano, incluso puede ocurrir lo mismo con los efectores del sistema inmunológico, impidiendo la eliminación de las poblaciones (Archer, 2011).

Por lo tanto, una vez que se suspenden los regímenes de antibióticos, los que persisten son capaces de salir espontáneamente de su estado de reposo y producir una reactivación de la infección, y por ende se exacerbaban los síntomas de la dermatitis atópica.

Un estudio realizado por Di Domenico en 2018, hizo una comparación entre la concentración mínima inhibitoria para erradicar a *S. aureus* en forma plactónica y formador de biofilm, como resultados se observó que *S. aureus* era sensible a una gran cantidad de antibióticos de forma plactónica, pero era “resistente” a estos mismos antibióticos cuando formaba biofilm, demostrando que el biofilm puede ser un factor que le confiere protección contra agentes antimicrobianos a *S. aureus*.

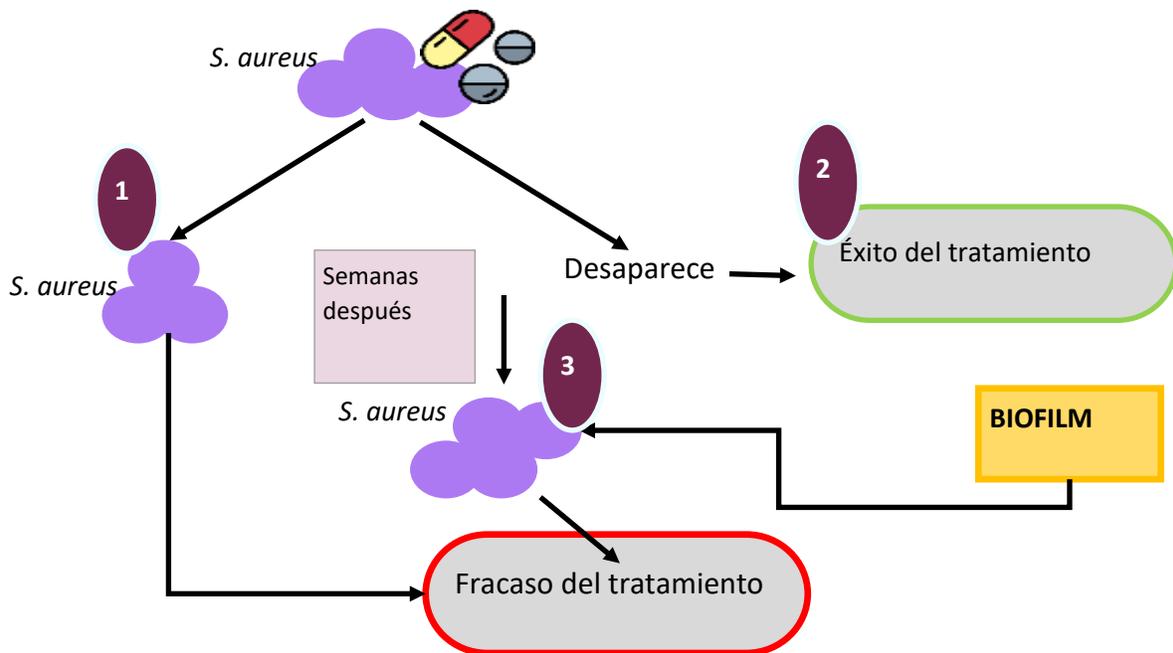


Fig 5 Cuando se administra una terapia antimicrobiana contra *S. aureus* en pacientes con DA, puede haber 3 posibles panoramas, el primero que la bacteria sea resistente y no tenga efecto la terapia sobre esta. El segundo que la bacteria sea eliminada y el tratamiento sea exitoso. La tercera que la bacteria “desaparezca” pero al paso de unas semanas se reactive la infección, por la tolerancia conferida por el biofilm, el antibiótico logra matar las bacterias superficiales del biofilm y las metabólicamente activas, pero no logra llegar a las bacterias más profundas e inactivas, cuando se suspende el tratamiento pensando que este ha sido eficaz, estas bacterias que lograron persistir al paso del tiempo pueden diseminarse y colonizar otros sitios de la dermis recalcitrando la infección.

Biofilm de *Staphylococcus aureus*

Los biofilm bacterianos representan una antigua estrategia de supervivencia procariota, las bacterias logran ventajas significativas al proporcionarles protección frente a fluctuaciones medioambientales (Nazar, 2015).

El biofilm se define como una comunidad microbiana sésil en donde las células crecen y se unen a una superficie u otras células y se incrustan en una matriz polimérica protectora extracelular. Este modo de crecimiento presenta fisiologías alteradas con respecto a la expresión génica y la producción de proteínas (Ortega, 2018).

El biofilm juega un papel importante si se habla de la patogénesis en infecciones estafilocócicas. Las bacterias incrustadas en el biofilm pueden sobrevivir en condiciones de estrés, daño por rayos UV, toxicidad por metales, condiciones anaeróbicas, exposición a ácidos, salinidad, gradientes de pH, desecación, bacteriófagos, amebas, y resistencia a antimicrobianos y defensa inmunológica del hospedero (Archer, 2011).

Composición y estructura del biofilm de *Staphylococcus aureus*

Los biofilm están estructurados principalmente por colonias de bacterias sésiles, que componen el 15%-20% del volumen del biofilm, embebidas en una matriz extracelular (ECM) o glicocálix, esta es capaz de secuestrar y concentrar nutrientes ambientales como el carbono, el nitrógeno y el fósforo, la matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura (Donlan, 2015).

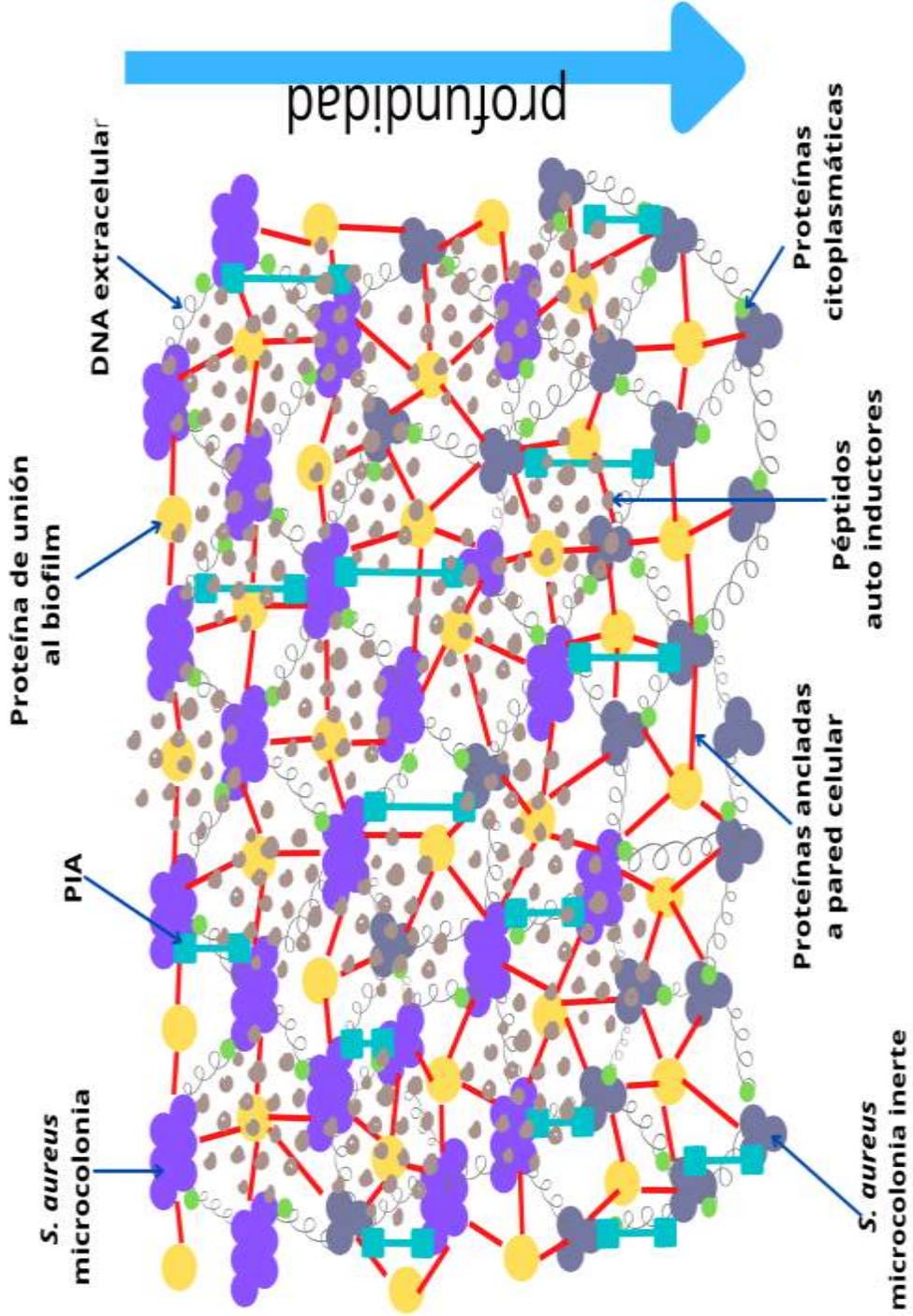


Fig 6 Esquema de la composición del biofilm de *S. aureus*. Formado por micro colonias bacterianas, activas e inertes y por la matriz polimérica extracelular compuesta principalmente por DNA extracelular, proteínas, polisacáridos.

Matriz extracelular. -

La ECM del biofilm de *S. aureus* se asemeja a un pegamento complejo que recubre todas las células en la estructura madura y está compuesta por factores del hospedero, proteínas secretadas y derivadas de la lisis, polisacáridos y DNA extracelular (eDNA) (Lister, 2014).

La ECM del biofilm retiene y mantiene próximas a las células entre sí, consiguiendo un elevado grado de interacción, comunicación intercelular y la formación de microconsorcios sinérgicos. Las colonias forman estructuras dependiendo de las condiciones ambientales. Existe una red de canales intrincados que fluyen a través de estas estructuras complejas y proporcionan cierta accesibilidad a nutrientes esenciales incluso en las regiones más profundas del biofilm (Kirmusaoğlu, 2016). Sin embargo, es necesario resaltar los organismos que forman parte del biofilm no se encuentran completamente inmovilizados, sino que tienen la capacidad de moverse en el interior del biofilm y hasta llegar a desprenderse del mismo (Moormeier, 2017)

Polisacárido PIA o PNAG.-

Los exopolisacáridos (EPS), son compuestos de la matriz, ayudan a las bacterias a adherirse a una multitud de diferentes superficies y células hospederas y bacterianas, proporcionan protección contra la avalancha de antimicrobianos en el medio ambiente, depósitos para la adquisición de nutrientes y ayudan en la creación de arquitecturas distintas, que potencian aún más un entorno adecuado para la bacteria y pueda persistir (Lister, 2014).

A diferencia de otras bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, que tienen varios tipos de EPS, los estafilococos solo producen una molécula de EPS dominante (Joo, 2012), y aunque al igual que otras bacterias Gram positivas *S. aureus* produce ácidos teicoicos implicados en la colonización y la formación de biofilm, debido a su presencia ubicua y enlace superficial covalente no se consideran EPS (Weidenmaier, 2008). El EPS presente en el biofilm de *S. aureus* es N-acetil-

glucosamina polimérica (PNAG), también conocida como la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA) (Nguyen,2020).

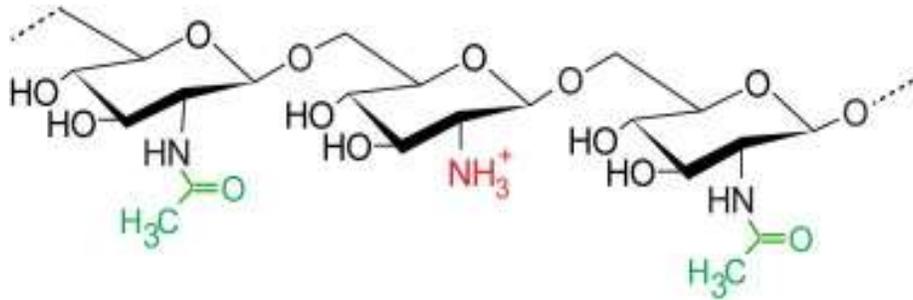


Fig 7 Estructura del PIA (Nguyen, 2020).

PIA también se encuentra en muchas otras bacterias filogenéticamente diversas. En *Escherichia coli*, por ejemplo, PIA se llama PGA y se codifica en el locus *pgaABCD* (Wang, 2004). PNAG es producido por enzimas codificadas en el locus *icaADBC*. Está compuesto por residuos de β-1,6-N-acetilglucosamina (80-85%) y una fracción aniónica con un menor contenido de residuos D-glucosaminil des acetilados que contienen fosfato y succinato unidos por enlaces éster (Limoli, 2015).

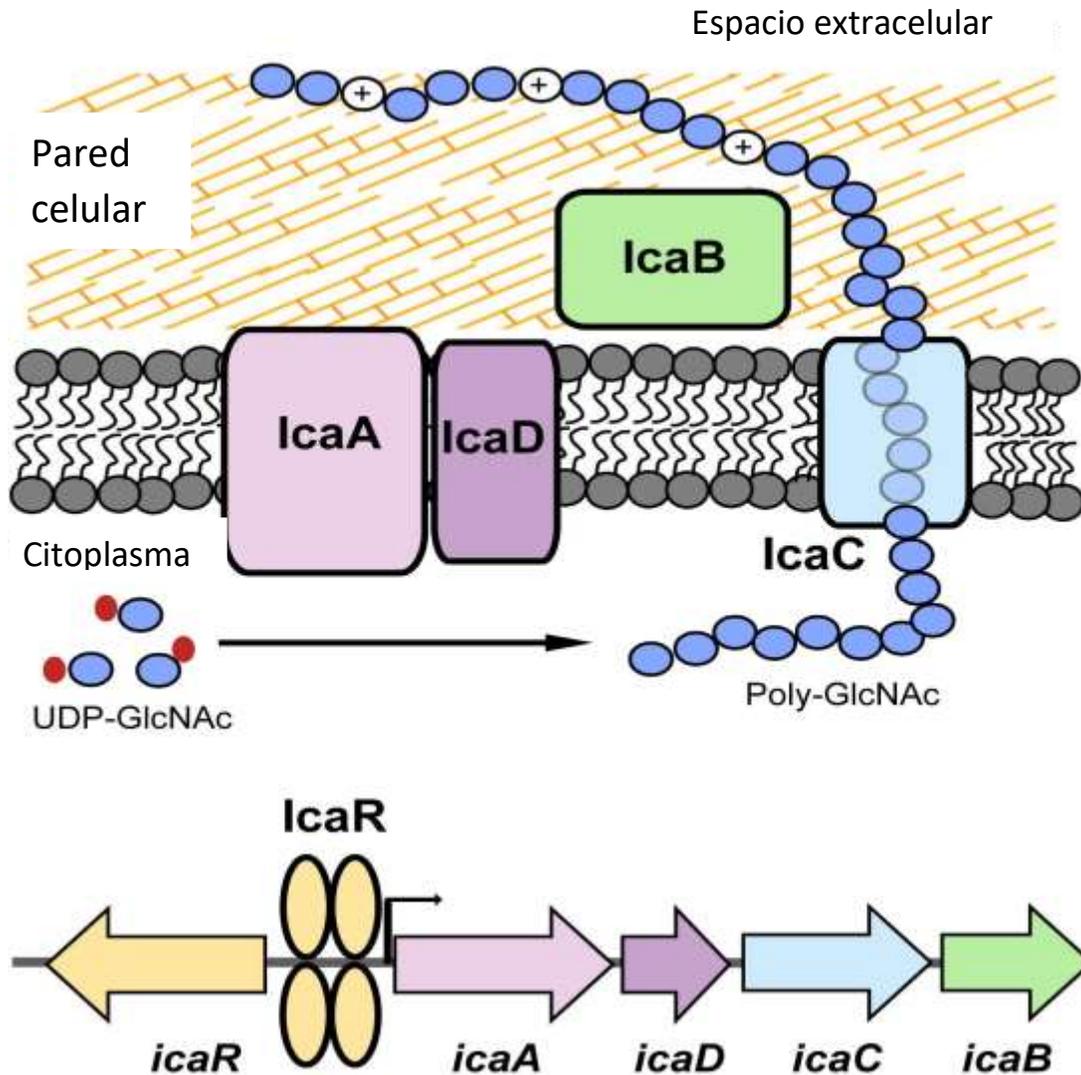


Fig 8 Formación de PIA. El locus *icaADB* contiene cuatro genes diferente *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*. El gen *icaA* codifica *N*-acetilglucosaminiltransferasa la cual es la principal enzima sintetizadora de PIA a partir de UDP-*N*-acetilglucosamina. Sin embargo, la actividad de transferasa de *IcaA* es baja y solo alcanza una alta eficacia en presencia de *IcaD*. *IcaAD* sintetizan una cadena de poli- acetilglucosamina en crecimiento. Es probable que esta cadena sea exportada por la proteína de membrana *IcaC*, aunque también se ha especulado que *IcaC* está involucrada en la *O*-succinilación de PIA. *IcaB* es una enzima que se une a la superficie externa bacteriana e introduce cargas positivas en la molécula de PIA, que de otro modo sería neutra, mediante la des acetilación de algunos residuos de acetilglucosamina. El carácter catiónico es vital para la adherencia a la superficie y la funcionalidad de PIA. La producción de PIA requiere de mucha energía, por lo cual es un proceso que requiere estricta regulación. La producción de PIA y la expresión de *ica* dependen de las condiciones ambientales, como la anaerobiosis, la concentración de sal, glucosa y alcohol. El locus *ica* contiene un regulador, *IcaR*, este regulador se une a una región específica de ADN aguas arriba de *icaA*, lo que da como resultado una fuerte supresión de la transcripción de *icaADB* (Nguyen, 2020).

Inicialmente se pensó que la PIA era crucial para la formación de biofilm, pero los estudios han demostrado que *S. aureus* es capaz de formar biofilm independiente de este PS, y la importancia de PIA parece depender de la cepa y/o condiciones ambientales (Fitzpatrick, 2005).

Curiosamente, cuando existe una delección del operón *icaADB* de *S. aureus*, las cepas de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) son capaces de desarrollar biofilm, mientras que las cepas de *S. aureus* sensibles a metilicina (MSSA) se ven afectadas en la formación de biofilm, esto plantea que la formación de biofilm de manera independiente de *ica* es específica de la cepa, la producción de la proteína A (SpA) es esencial para la formación de biofilm, también las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) pueden arbitrar la formación, a través de un papel esencial por la regulación principal de autolisina (Atl) y el factor sigma (*sigB*), además, la proteína asociada a biofilm y las proteínas relacionadas con Bap de *S. aureus* pueden conferir el desarrollo de biofilm independiente de la producción de PIA a través de la agregación de célula a célula, y se caracterizan por su alto peso molecular, y su presencia en la superficie bacteriana (Archer, 2011).

Proteínas. -

Se pueden agrupar las proteínas en dos grandes grupos, por un lado, se tienen las proteínas intracelulares que probablemente se liberaron por lisis celular y se incorporan inespecíficamente al ECM (Foulston, 2014). Y el otro grupo son las proteínas que le permiten a las bacterias adherirse y formar su ECM, es importante recordar que hay matrices extracelulares que solo se basan en proteínas, como en el caso de los biofilm independientes de *ica*.

La proteína de superficie Bap de *S. aureus* se identificó como el principal factor determinante de la adherencia exitosa a la superficie, así como de la acumulación intercelular durante el desarrollo de biofilm. El papel de varios componentes de la superficie microbiana reconocen las moléculas de la matriz adhesiva (MSCRAMM) se extiende más allá del vínculo inicial. Las FnBPA y FnBPB y la proteína repetida

de serina-aspartato (SdrC) promueven interacciones célula-célula que conducen a una mayor formación de biofilm (Sugimoto, 2013).

Otra proteína bien estudiada es SasG media la formación de biofilm logrando la autoadhesión y la adhesión intercelular mediada por zinc (Schilcher,2020). Y la adhesina Eap mejora la adherencia de *S. aureus* a la matriz extracelular, y también puede auto asociarse para inducir la agregación de *S. aureus* (Abraham, 2012).

DNA extracelular. -

El DNA extracelular (eDNA) es un componente muy importante cuando se habla de producción de biofilm, se encuentra prácticamente en todos los biofilm bacterianos no únicamente en el de *S. aureus*, numerosos estudios buscan una solución para prevenir infecciones crónicas causadas por biofilm, utilizan DNAsas, concluyendo que al utilizarlas se elimina o se evita la formación del biofilm (Whitchurch, 2002). Demostrando su papel fundamental dentro del biofilm.

Debido a la carga negativa del polímero de eDNA potencialmente actúa como un polímero electrostático ancla las células a una superficie, a los factores del hospedero y entre sí, desempeñando un papel importante en la formación de biofilm de *S. aureus*, especialmente en la formación de biofilms independientes de PNAG (Dengler, 2015).

El eDNA se produce a través de la autólisis de una subpoblación de las células del biofilm (Thomas, 2009), y este tipo de lisis está mediado por la actividad de las hidrolasas de mureína que degradan el peptidoglicano y típicamente juegan un papel importante durante los reordenamientos de la pared y la división celulares, la autólisis está regulada a través de la actividad de dos operones, *cidABC* y *IrgA* (Sadykov, 2012). Rice *et al*, descubrió una mutación de *cidA*, conducía a un biofilm menos adherente y contiene niveles bajos de eDNA, demostrado que el gen *cidA* está implicado en la lisis celular necesaria para la liberación de eADN y el desarrollo de biofilm.

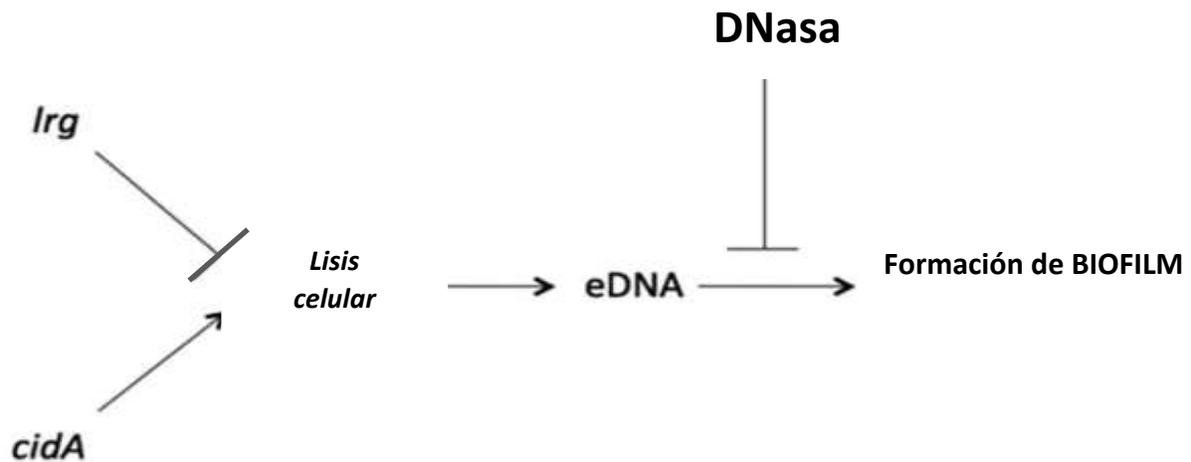


Fig 9 eDNA y formación de biofilm: eDNA conduce a una mayor formación de biofilm. Se ha visto que el tratamiento de biofilm con DNasa degrada el eDNA e inhibe la formación de biofilm. La liberación de DNA se arbitra a través de la lisis celular y se controla mediante la expresión de los genes *lrg* y *cidA*. La regulación positiva del gen *lrg* da como resultado la inhibición de la lisis celular, evitando liberación de ADN y la formación de biofilm. Por el contrario, la expresión del gen *cidA* mejora la lisis celular, la liberación de ADN y la formación de biofilm.

eDNA, ADN extracelular; *lrg*, regulador de la mureína hidrolasa y muerte celular; *cidA*, regulador de la mureína hidrolasa y de la muerte celular (Archer, 2011).

Control genético del metabolismo del biofilm

La formación de biofilm es un proceso complejo y ampliamente regulado, no existe una vía de señalización única y bien determinada para el fenotipo formador de biofilm, atribuido a múltiples factores que contribuyen a la matriz extracelular del biofilm, varían según la especie bacteriana pero también, dentro de la misma especie, según el tipo de cepa. (Schwartz, 2012).

Para que una bacteria pueda sobrevivir dentro de un biofilm, debe pasar por cambios globales en la regulación génica para adaptarse (Harraghy, 2005). Se ha visto que SigB actúa en las primeras etapas del biofilm, para formar un biofilm temprano (Archer, 2011). SigB es un importante regulador de la virulencia de *S. aureus*, el factor de aglomeración, la proteína A de unión a FnBPA y la coagulasa, están todos regulados al alza por SigB, mutantes del gen *sigB* no puede formar biofilm, a mayor expresión de SigB siempre va acompañada de una mayor formación de biofilm (Lui, 2018).

La vía por la cual actúa SigB en la formación del biofilm no está del todo determinada, Lui *et al*, demostraron la expresión de *nuc*, termonucleasa implicada en la degradación del biofilm se ve reprimida su expresión en presencia de SigB, lo cual permite exista una acumulación masiva de eDNA en el desarrollo del biofilm. Por otra parte, la eliminación de SigB conduce a la regulación positiva del precursor de la termonucleasa (Lui, 2018). Múltiples estudios han concluido *S. aureus* deficiente en sigB *no* puede formar biofilm y que esta deficiencia da como resultado una regulación al alza de RNAIII, un componente vital del sistema *agr* que promueve la dispersión del biofilm y reduce su formación (Valler, 2001).

Los factores que tienen una correlación con la dispersión del biofilm y un fenotipo planctónico como la β -hemolisina, enterotoxina B, la estafilopóinas y la leucotoxina D están todos controlados negativamente por SigB (Kullik, 1997).

Una vez establecido un biofilm temprano por SigB, el comportamiento dentro de la población bacteriana y el estado de densidad o crecimiento del microorganismo se controla mediante un mecanismo de señalización célula-célula o comunicación bacteriana llamado quorum sensing (QS), a través de señales, que pueden pertenecer a la misma especie o a una diferente, sintetizadas a través del ribosoma bacteriano, y requeridas para la supervivencia y propagación de la bacteria en medios ambientes naturales u hostiles (Paharik, 2016).

La regulación dependiente de la densidad de la mayoría de los factores de virulencia está mediada por loci reguladores como el regulador de genes accesorios (*agr*) y los loci reguladores accesorios estafilocócicos (*SarA*) (Dunman, 2001).

El sistema *agr*, es un sistema de detección de quórum peptídico presente en todos los estafilococos y un regulador dominante de la patogénesis y el desarrollo de biofilm en *S. aureus* (Paharik, 2016).

El sistema *agr* funciona mediante la detección de niveles extracelulares de AIP producido por estafilococos durante el crecimiento. La naturaleza química de esta señal AIP es variable dependiendo de la especie, e incluso puede tener múltiples

tipos dentro de una especie. Brevemente, el AIP se libera fuera de la célula donde se acumula en el medio, y a una concentración particular, AIP se une a la histidina quinasa agrC expuesta en la superficie, dando como resultado la fosforilación del regulador de respuesta agrA, que a su vez induce, la transcripción reguladora RNAIII principal molécula efectora. Paralelamente, agrA activa la transcripción de los transcritos de las modulinas solubles en fenol alfa y beta (PSM α y PSM β). (Kirmusaoğlu, 2016).

Durante las primeras etapas de desarrollo de biofilm, se requiere una expresión de agr baja, mientras que en la última etapa la activación de agr, induce la dispersión al estado planctónico. El proceso de dispersión está mediado por proteasas reguladas por agr, prominentemente las enzimas estafilopóinas, que tienen como receptor las proteínas de la matriz del biofilm (Mootz, 2013). La regulación de agr sobre las proteasas es a través de Rot, cuya represión transcripcional se reduce cuando se induce agr (Mootz, 2015). Las PSM tienen actividad tensoactiva anti-biofilm y en conjunto degradan la matriz del biofilm para permitir la dispersión (Kirmusaoğlu, 2016).

Las condiciones ambientales son un factor crítico en el control de la función Agr, el pH bajo por ejemplo puede reprimir la actividad de Agr. Para el desarrollo de un biofilm de *S. aureus in vitro*, se debe proporcionar un exceso de azúcar (Glucosa) para desencadenar la disminución del pH y promover la formación de biofilm. La expresión de factores regulados por Agr, como las estafilopóinas, debe reprimirse para que las células de *S. aureus* se adhieran e inicien el desarrollo de biofilm. Desde un punto de vista de estudio del biofilm *in vitro* la represión de Agr, es muy importante, pero en una infección por biofilm *in vivo* el hecho de que *S. aureus* pueda dispersar su biofilm es vital para colonizar y persistir (Archer, 2011).

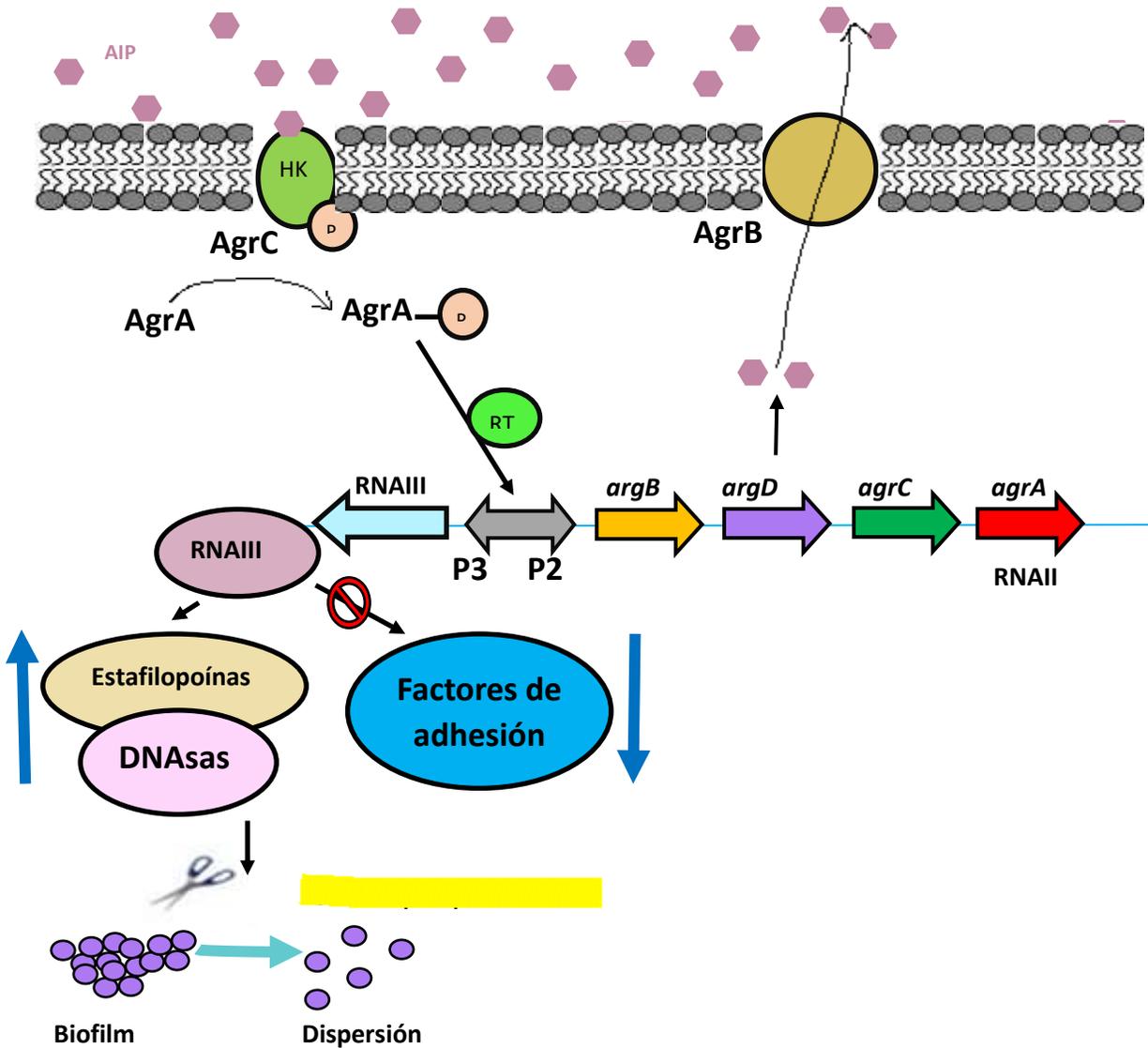


Fig 10 El crecimiento post-exponencial activa el locus agr, que contiene dos promotores divergentes, P2 y P3, que dirigen la expresión de las transcripciones de ARNII y ARNIII, respectivamente. El ARNII codifica cuatro proteínas, AgrB, AgrD, AgrC y AgrA, todas las cuales son necesarias para la regulación del factor de virulencia mediada por agr. AgrD y AgrB actúan para generar una molécula sensora de quórum octapeptídica (péptido autoinductor [AIP]), que, después de alcanzar una concentración umbral extracelular, estimula la activación de AgrC y AgrA, el sensor y el regulador, respectivamente, de una vía reguladora de dos componentes. AgrA activado da como resultado la regulación positiva de la producción de ARNII y ARNIII; esta última es la molécula efectora de la respuesta agr. La expresión de ARNIII regula la expresión de varios factores de virulencia y genes asociados a biofilm para degradar la matriz y se puedan liberar las microcolonias y la regula a la baja de la transcripción de proteínas de la superficie celular. las células platónicas liberadas son capaces de colonizar y evadir respuesta inmune del hospedero por la expresión de sus factores de virulencia activos (Kirmusaoğlu, 2016). (Imagen adaptada de Marquina, 2010)

Los principales reguladores mundiales, el regulador accesorio estafilocócico (*sarA*) y el regulador génico accesorio (*agr*)

La proteína SarA de *S. aureus* influye en la expresión de algunos factores de virulencia asociados a la pared celular y extracelulares, el locus *sar* contiene tres transcritos superpuestos denominados *sarA*, *sarC* y *sarB*, se ha encontrado que SarA, es la principal proteína reguladora codificada dentro de *sar* (Dunman, 2001).

SarA se une a regiones conservadas denominadas cajas Sar, homóloga al sitio de unión de SarA en el promotor *agr*, los genes objetivo codifican proteínas de la superficie celular (*spa*, codifican proteína A), y exoproteínas (*hla*, codifican alfa-hemolisina) (Chien, 1999). La unión de SarA a *agr* aumenta la transcripción tanto de ARNII como de ARNIII y, por lo tanto, contribuyen indirectamente a la regulación del factor de virulencia (Chien, 2002).

En un estudio realizado con un mutante de *agr*, se encontró que SarA puede regular la expresión de *spa* y *hla*, lo que indica que SarA controla la regulación de ciertos factores de virulencia directamente, de manera independiente de *agr* (Pratten, 2001).

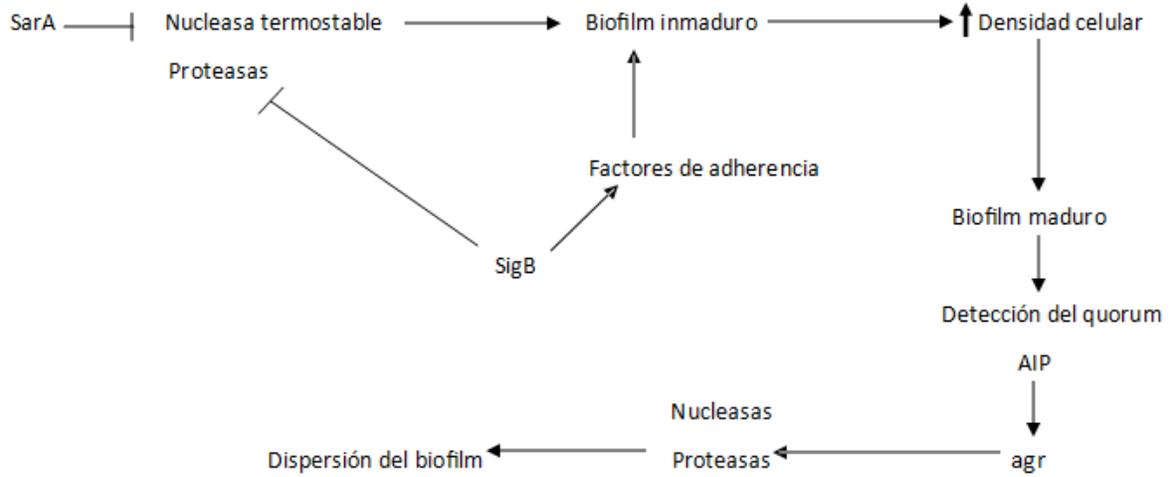


Fig 11 Regulación agr/sarA/sigB: Cuando SarA se expresa, da como resultado la regulación de las proteasas y la termonucleasa, lo que permite el desarrollo de un biofilm inmaduro, por su parte SigB regula a la baja proteasas, pero promueve la expresión de factores de adherencia que apoya en la formación inicial del biofilm. Un biofilm inmaduro aumenta en densidad celular y componentes de la matriz hasta que se desarrolla un biofilm maduro. Las bacterias viven comunicadas dentro de este biofilm y en esta etapa, la densidad de AIP en toda la comunidad bacteriana alcanza un umbral de detección de quórum e induce la expresión del gen agr. Inducción de agr da como resultado una regulación al alza de la expresión de péptidos similares a detergentes, proteasas y nucleasas termoestables; lo que lleva a la liberación de células bacterianas del biofilm, provocando la dispersión de este (Archer, 2011). SarA, regulador accesorio estafilocócico; sigB, factor sigma B; AIP, péptidos autoinductores; agr, regulador de genes accesorios.

Tabla 2 Genes involucrados en la formación de biofilm de *S. aureus*

Gen	Proteína	Función	Referencia
<i>icaADBC</i>	Adhesina intercelular (PIA)	Dar estructura al biofilm, adherencia, protección mecánica.	(Heilmann,2003)
<i>icaR</i>	IcaR	Supresión de la formación de PIA	(Nguyen, 2020)
<i>hla</i>	alfa-hemolisina	Interacción célula-célula	(Caiazza, 2003)
<i>clfA</i>	Factor de aglutinación A, proteína de unión fibrinógeno	Adherencia, evasión de la respuesta inmune.	(Vaudaux,1995)
<i>dltA</i>	Esterificación con D-alanina de los ácidos teicoicos	Adherencia, protección mecánica	(Groos, 2001)
<i>SigB</i>	Respuesta alternativa al factor sigma-estrés	Control de adhesinas, represión de nuc.	(Rachid,2000)
<i>agr</i>	AIP. AgrA, AgrB. AgrC, AgrD	Comunicación y regulación celular dentro del biofilm.	(Kirmusaoğlu, 2016)
<i>SarA</i>	sarA, sarC y sarB	Control sobre la expresión de agr, control de adhesinas.	(Pratten, 2001)
<i>cid</i>	cidA, cidB, cidC	Promueve la lisis celular	(Sadykov, 2012)
<i>Irg</i>	IrgA, IrgB	Inhibe la lisis celular	(Rice, 2007)
<i>Nuc</i>	Termonucleasa	Degradación de eDNA	(Moormeier, 2013)

Adaptada de Jefferson,2004.

Desarrollo del biofilm de *Staphylococcus aureus*

La formación de biofilm bacteriano es un proceso complejo y multifactorial. Al igual que otras especies bacterianas, el desarrollo del biofilm de *Staphylococcus aureus* posee etapas similares, cumpliendo las 3 básicas, adherencia a una superficie, maduración y dispersión, sin embargo, se han observado dos procesos en la etapa inicial para formar el biofilm de *S. aureus* madura en capas gruesas de células. El desarrollo del biofilm de *S. aureus* avanza a través de un proceso de desarrollo de cinco etapas que incluye 1) fijación, 2) multiplicación, 3) éxodo, 4) maduración y 5) dispersión (Moormeier, 2017).

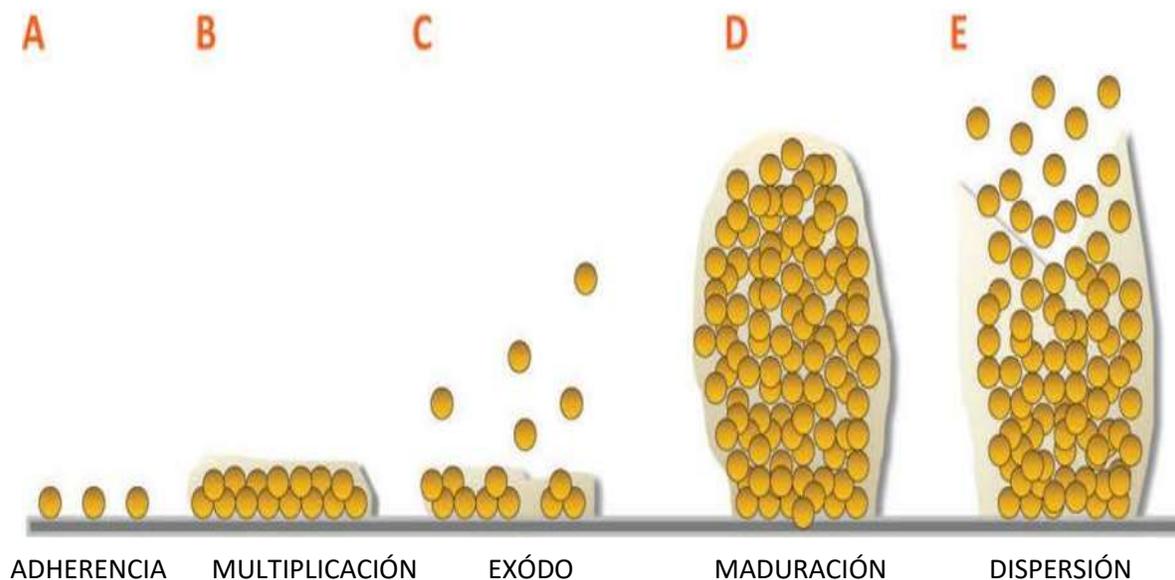


Fig 12 Descripción de las 5 etapas de desarrollo del biofilm de *S. aureus*, A) fijación, B) multiplicación, C) éxodo, D) maduración y E) dispersión. Básicamente *S. aureus* se une a una superficie, por conducto de interacciones hidrófobas o MSCRAMM, dependiendo el origen de la superficie, posterior a la unión, el biofilm comienza como un monocapa confluyente de células compuesta por un eADN y una matriz proteica. Al alcanzar la confluencia, se produce un período de éxodo (reproducción) masivo de células en el que se libera una subpoblación de células del biofilm, para permitir la maduración de estas poblaciones en forma de micro colonias tridimensionales, compuestas de proteínas que incluyen PSM y eDNA, a través de la detección de quórum, inicia la modulación de la matriz de biofilm y la dispersión (Moormeier, 2017)

Adherencia del biofilm de *Staphylococcus aureus*.-

Cuando las condiciones favorecen la formación de biofilm, comienza con la adherencia de las bacterias a una superficie que actúa como sustrato para la adhesión. Una superficie podría ser atractiva o repulsiva para las bacterias según los diferentes parámetros, incluidas las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, las fuerzas hidrodinámicas y la temperatura. Las bacterias pueden adherirse a una superficie biótica o abiótica gracias a la participación de moléculas bacterianas específicas de la superficie (Reffuveille, 2016).

S. aureus tiene factores de virulencia para comenzar la formación del biofilm a través de la unión a múltiples componentes del hospedero como fibronectina, fibrinógeno, colágeno y citoqueratina, estos factores juegan un papel mínimo cuando se unen directamente a los materiales abióticos. En ausencia de moléculas de la matriz del hospedero, como la superficie plástica de un dispositivo médico permanente o ensayos de determinación de biofilm, la unión depende de las características fisicoquímicas del dispositivo y de las superficies bacterianas (Otto, 2013). Uniéndose principalmente a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, entre las moléculas de superficie bacterianas específicas en este proceso, como la proteína de superficie autolisina (Aap) y los ácidos teicoicos (Moormeier, 2017).

La carga de los ácidos teicoicos juega un papel fundamental en el paso inicial de la formación del biofilm, en superficies abióticas, *S. aureus* puede adherirse a superficies hidrofóbicas o ligeramente cargadas negativamente, como el poliestireno o el vidrio, respectivamente. La interacción directa de bacterias y superficies depende de las fuerzas de vander Waals, que generalmente son atractivas, incluso si las bacterias y las superficies están cargadas por igual, las fuerzas de Van der Waals pueden superar la repulsión y conducir a la adhesión (Gross, 2001)

La unión a una superficie biótica como el tejido humano se rige por interacciones completamente diferentes y mucho más específicas (Otto, 2013). El genoma de *Staphylococcus aureus* codifica más de veinte adhesinas (Speziale, 2014), la adhesión estafilocócica de biofilm está mediada por proteínas ancladas a la pared (CWA) covalentemente, proteínas asociadas no covalentemente y factores no proteicos (Paharik, 2016).

Multiplicación del biofilm de *Staphylococcus aureus*. -

La segunda etapa de desarrollo del biofilm es la multiplicación, una vez que la bacteria logro fijarse a una superficie, y en presencia de una fuente de nutrientes, las células de *S. aureus* comenzarán a dividirse y acumularse. No obstante, antes de la producción de un ECM en el que incrustarse, las células hijas recién formadas son vulnerables al desprendimiento, especialmente en presencia de las fuerzas de corte asociadas con el flujo de fluido (Moormeier, 2017).

Las proteínas CWA facilitan la acumulación del biofilm al promover la unión intercelular poco después de la fijación (Speziale, 2014). Durante la etapa de multiplicación, *S. aureus* utiliza proteínas citoplasmáticas que se liberan por una "autólisis regulada" similar a la de eDNA, para componer la matriz, como la enolasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se unen al eDNA liberado en condiciones de pH bajo (Foulston, 2014) PIA funciona como componente del ECM precoz durante la formación temprana del biofilm de *S. aureus*. (Moormeier, 2013).

Tabla 3 función de las proteínas CWA

Familia	Proteína	Función
1. MSCRAMM Clf-Sdr	ClfA	Adhesión al fibrinógeno; degradación de C3b. Evasión inmune
	ClfB	Unión al fibrinógeno, queratina y lorricrina. Colonización nasal por adhesión. a las células epiteliales descamadas
	SdrC	Unión a β -neurexina. Adhesión a células epiteliales nasales descamadas
	SdrD	Adhesión células epiteliales nasales descamadas.
FnBp	FnBpA	Unión al Fibrinógeno, fibronectina y elastina, adhesión a la matriz extracelular; invasión del huésped celular.
	FnBpB	Unión a fibronectina. Adhesión a la matriz extracelular; invasión del huésped celular
Cna	Cna	Unión de colágeno. Adhesión a la matriz extracelular
2. NEAT	IsdA	Unión al Hemo, fibrinógeno, fibronectina, citoqueratina y loracrina. Captura de hemo y absorción de hierro; nasal colonización
	IsdB	Unión hemo, hemoglobina y 3β integrinas. Captura de hemo y absorción de hierro; Invasión de células no fagocíticas.
	IsdH	Unión a hemoglobina. Hemo captura y adquisición de hierro; inmune evasión por degradación de C3b.
3. paquetes de tres hélices	Proteína A	Unión de IgG, IgM y TNRF1. Evasión de la respuesta inmune; aumento de la inflamación durante neumonía e infección de la piel.
4. G5-E	SasG	Adhesión a células epiteliales descamadas; formación de biofilm.

Tomada de Jan, 2017.

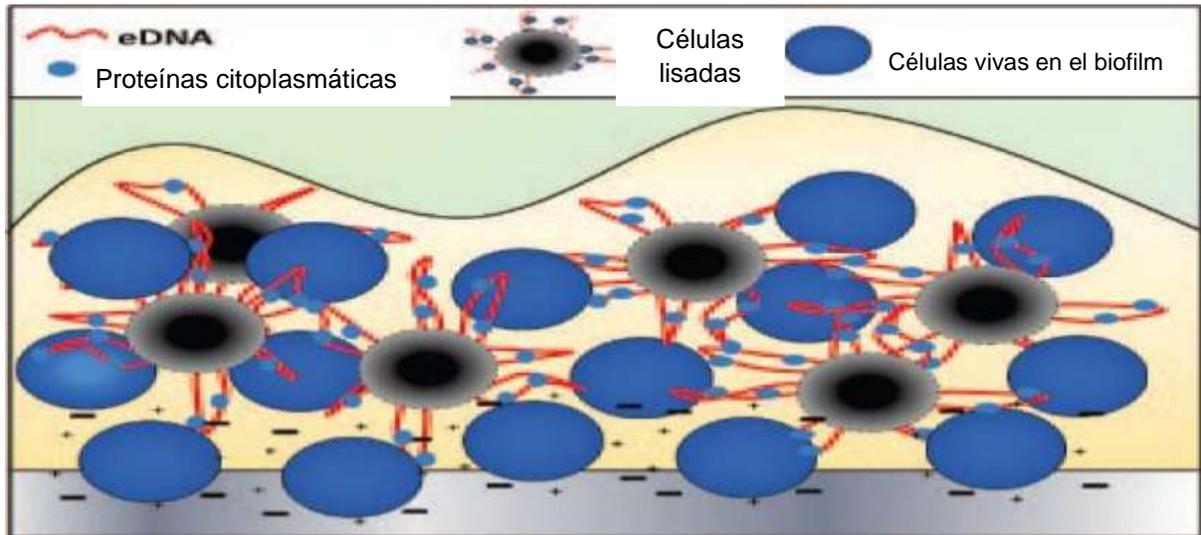


Fig 13 Modelo de interacciones celulares durante la etapa de multiplicación del desarrollo del biofilm, durante las etapas iniciales del desarrollo, las células planctónicas se unen a una superficie a través de interacciones electrostáticas (indicadas por los símbolos + y -) que involucran ácidos teicoicos, PS y autolisina A. A medida que el desarrollo progresa en la etapa de multiplicación, una subpoblación de las células muere y lisa (círculos negros) liberando ADN extracelular (líneas rojas) y proteínas citoplasmáticas (óvalos azules claros) en el medio extracelular, encerrando las células vivas existentes (círculos azules) en una mezcla de proteínas citoplasmáticas y ADN genómico (Moormeier, 2017).

Éxodo del biofilm de *Staphylococcus aureus*.-

Es un evento de dispersión temprana independiente del sistema *Agr*, donde ocurre la formación de microcolonias a partir de distintos focos de células que permanecen en la capa basal y da como resultado la reestructuración del biofilm, mediada por la degradación dependiente de nuc. El eDNA es degradado dentro de la matriz del biofilm por nuc una nucleasa secretada de producción propia que reduce la biomasa total del biofilm de *S. aureus* (Moormeier, 2017).

Esta es una fase estrictamente regulada del desarrollo, donde solo una subpoblación de células dentro del biofilm expresa nuc dependiente de *Sae*, lo que resulta en la secreción de nucleasa que modera el desprendimiento de la mayoría de la población del biofilm acumulado (Moormeier, 2013).

La reducción de la población celular durante el desarrollo precoz del biofilm a través del éxodo, juega un papel indispensable para la formación de la estructura secundaria (madura) (Moormeier, 2017). En estudio realizado por Moormeier y colaboradores, demuestran, en ausencia del éxodo, como en una mutante de *S. aureus nuc*, no se observa formación de microcolonia ni el paso de la estructuración del biofilm precoz a maduro (Moormeier, 2013).

Maduración del biofilm de *Staphylococcus aureus*

La maduración del biofilm comprende la adaptación y fijación de las microcolonias proporcionando un área de superficie incrementada para el intercambio de nutrientes y la eliminación de desechos, así como para promover la diseminación de las células del biofilm a sitios distales (Moormeier, 2017).

Entre las microcolonias existen distintas velocidades de crecimiento, con diferentes patrones de expresión génica y propiedades físicas. Algunas microcolonias adoptan un estado de crecimiento rápido colocándose en la parte las externas y distales del biofilm y por otra parte existen microcolonias de lento crecimiento en la parte más interna del biofilm, los operones asociados con la muerte celular *cidABC* y *IrgAB*, han permitido delinear estos dos tipos de microcolonias, la de rápido crecimiento que exhibió expresión constitutiva de *IrgAB* pero retrasó la expresión de *cidABC*, en respuesta a la naturaleza hipóxica de la microcolonia a medida que aumenta de tamaño. La microcolonia que crece a un ritmo más lento y expresa *cidABC* constitutivamente, sin expresión de *IrgAB* (Moormeier, 2013).

Estas microcolonias, junto con la matriz temprana que se había formado constituyen un biofilm maduro, con características de subpoblaciones metabólicamente diversas que permiten disminuir (o eliminar) el tiempo requerido para adaptarse al estrés por nutrientes y oxígeno, así como proporcionar un contexto metabólico importante para resistir los factores antibacterianos (por ejemplo, a través de la

tolerancia a los antimicrobianos por formación de células persistentes) presente en el medio ambiente y persistir en la zona colonizada (Moormeier, 2017).

Dispersión del biofilm de *Staphylococcus aureus*. -

Ya establecido el biofilm maduro, este se puede dispersar debido a las condiciones ambientales. Si el estrés al que está sometido el biofilm se vuelve demasiado grande, se promueve la dispersión de las células, aumentando las posibilidades de que estas células se encuentren con un ambiente más habitable. En gran medida la dispersión del biofilm de *S. aureus* está bajo el control de la detección del QS de *Agr*, el sistema *Agr* depende de la densidad celular y de la acumulación de moléculas de señal llamadas autoinductores, más específicamente AIP (Moormeier, 2017).

Las colonias que se dispersan del biofilm y logran encontrar un ambiente más habitable pueden volver a formar biofilm comenzando el ciclo de nuevo (Figura 12).

JUSTIFICACIÓN

El microbioma de la piel de pacientes con DA se encuentra preferentemente colonizado por *S. aureus*, provocando un agravamiento en el fenotipo de la enfermedad, mayores gastos en tratamiento, pérdida del sueño entre otros factores que afectan la calidad de vida del paciente con DA y su cuidador (Marron, 2020).

Algunas referencias indican el tratamiento con antibiótico para *S. aureus*, no presenta la respuesta deseada, este solo reduce o elimina aparentemente a *S. aureus*, y la recolonización frecuente ocurre en pocas semanas con una mejoría clínica limitada. La dificultad para erradicar la colonización por *S. aureus* con la terapia antibiótica convencional puede evocar la presencia de biofilm (Di Domenico, 2018).

Staphylococcus productor de biofilm se ha vuelto notorio por causar infecciones crónicas, recalcitrantes, con poca respuesta a terapias antimicrobianas, llevado a un aumento significativo en los gastos asociados con infecciones de *S. aureus* durante la última década, con costos anuales estimados cercanos a los \$450 millones (Parvizi, 2010).

En consecuencia, una mejor comprensión del desarrollo y frecuencia de biofilm de *S. aureus*, en piel de pacientes con DA permitiría generar estrategias de tratamiento adecuado y reducir las cargas significativas causadas por este patógeno.

OBJETIVO

Determinar el grado de producción de biofilm en aislados de *Staphylococcus aureus* de niños mexicanos con dermatitis atópica del Instituto Nacional de Pediatría.

Objetivos particulares

- Cuantificar la producción de biofilm en los aislados por medio de la técnica de cristal violeta en placa.
- Determinar si hay relación entre presencia de biofilm del *S. aureus* y el que esta colonizando a los pacientes con DA, forman biofilm preferentemente.
- Determinar si el grado de producción de biofilm influye en el agravamiento del fenotipo de la dermatitis atópica.

METODOLOGÍA

Cepas de *S. aureus*

Se estudiaron 127 aislados de *S. aureus* provenientes de 4 niños mexicanos con Dermatitis atópica, de un cepario conformado entre 2017 y 2018 en el Instituto Nacional de Pediatría (INP). Los aislados clínicos de *S. aureus* se obtuvieron del cultivo de hisopados de piel de 7 regiones anatómicas durante 5 visitas.

Tabla 4 Características de los pacientes trabajados

Paciente	Características de DA	Zonas anatómicas seguidas
4	SCORARD objetivo disminuyo 15 o más puntos de la visita 1 a la 5 (Respuesta al tratamiento favorable)	Codo derecho con lesión, Codo izquierdo con lesión antebrazo derecho sin lesión, antebrazo izquierdo sin lesión y narina
9	Dermatitis persistente moderada severa en todo el estudio (No respuesta al tratamiento)	Rodilla derecha con lesión, antebrazo izquierdo sin lesión y narina
26	SCORARD objetivo disminuyo 15 o más puntos de la visita 1 a la 5 (Respuesta al tratamiento favorable)	Codo izquierdo con lesión, antebrazo derecho sin lesión y Narina
16	Dermatitis persistente moderada severa en todo el estudio (No respuesta al tratamiento)	Codo derecho con lesión, Antebrazo derecho sin lesión y Narina

Cultivo de *S. aureus* para el ensayo de biofilm.

Cada cepa se creció en placas de agar infusión cerebro corazón a 37°C por 24 horas. Enseguida, los crecimientos se ajustaron a una concentración 0.5 escala de MacFarland (1.5 x 10⁸ UFC/mL) en SSF 0.9%.

Ensayo de cristal violeta para evaluar la producción de biofilm.

Para la producción de biofilm se usó el ensayo semicuantitativo descrito por Singh et al (2017), donde se utiliza como control las cepas ATCC de *Staphylococcus*

epidermidis, control positivo *S. epidermidis* ATCC RP62 (alta productora de biofilm) y negativo *S. epidermidis* ATCC 12228 (no productora de biofilm) (Singh, 2017).

El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos con fondo plano, bajo el siguiente protocolo: Colocar en cada pozo 190µL de caldo BHI suplementado con 222.2mM de glucosa, 116.9mM sacarosa y 1000mM de NaCl (anexo 1), agregar 10µL de la correspondiente suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de MacFarland (Fig. 14), todo esto en condiciones de esterilidad e incubar a 37°C por 24 horas, todo por triplicado.

Concluido el tiempo de incubación, cerca del mechero se remueve el caldo BHI residual utilizando micropipeta y puntas diferentes para cada pozo (sin tocar el fondo del pozo) con el fin de no mezclar el contenido entre los mismos.

Una vez que el pozo contiene la menor cantidad de caldo posible, se procede a realizar lavados con PBS1x. Colocar 200uL de PBS 1x en todos los pozos de la placa y retirar este PBS1x con micropipeta y puntas diferentes para cada pozo (sin tocar el fondo del pozo) con el fin de no mezclar el contenido entre los mismos. El siguiente lavado con PBS1x, se realiza agregando 200uL en todos los pozos y retirando el PBS invirtiendo la placa en un solo movimiento brusco sobre el recipiente de desechos utilizado, para eliminar completamente el excedente se golpea suavemente la placa contra toallas de papel, hasta completar 2 lavados para eliminar las bacterias planctónicas antes de la fijación, es importante durante los lavados no tocar la base de la placa.

El biofilm se fija por calor, introduciendo la placa a la incubadora a una temperatura 60°C por 20 minutos, al terminar la fijación se deja a temperatura ambiente y se almacena sellando la placa con papel parafilm, hasta su lectura en el INP.

Proceso antes de leer en el lector de placas. –

El biofilm fijado se tiñe, añadiendo 175µL de colorante cristal violeta a 0.5% (anexo 1), en agitación durante 5 minutos y se remueve el colorante con micropipeta y puntas distintas para no mezclar el contenido entre pozos.

Al retirar el colorante, se lava la placa con agua destilada 3 veces de la misma forma que se realizaron los dos últimos lavados con PBS, y se deja secar a temperatura ambiente (10 minutos aproximadamente). Una vez seca la placa, el colorante se eluye con 150µL de una solución alcohol: acetona (80:20) (anexo 1).

Posteriormente se debe leer la absorbancia de la placa a una longitud de onda de 550nm (anexo 2).

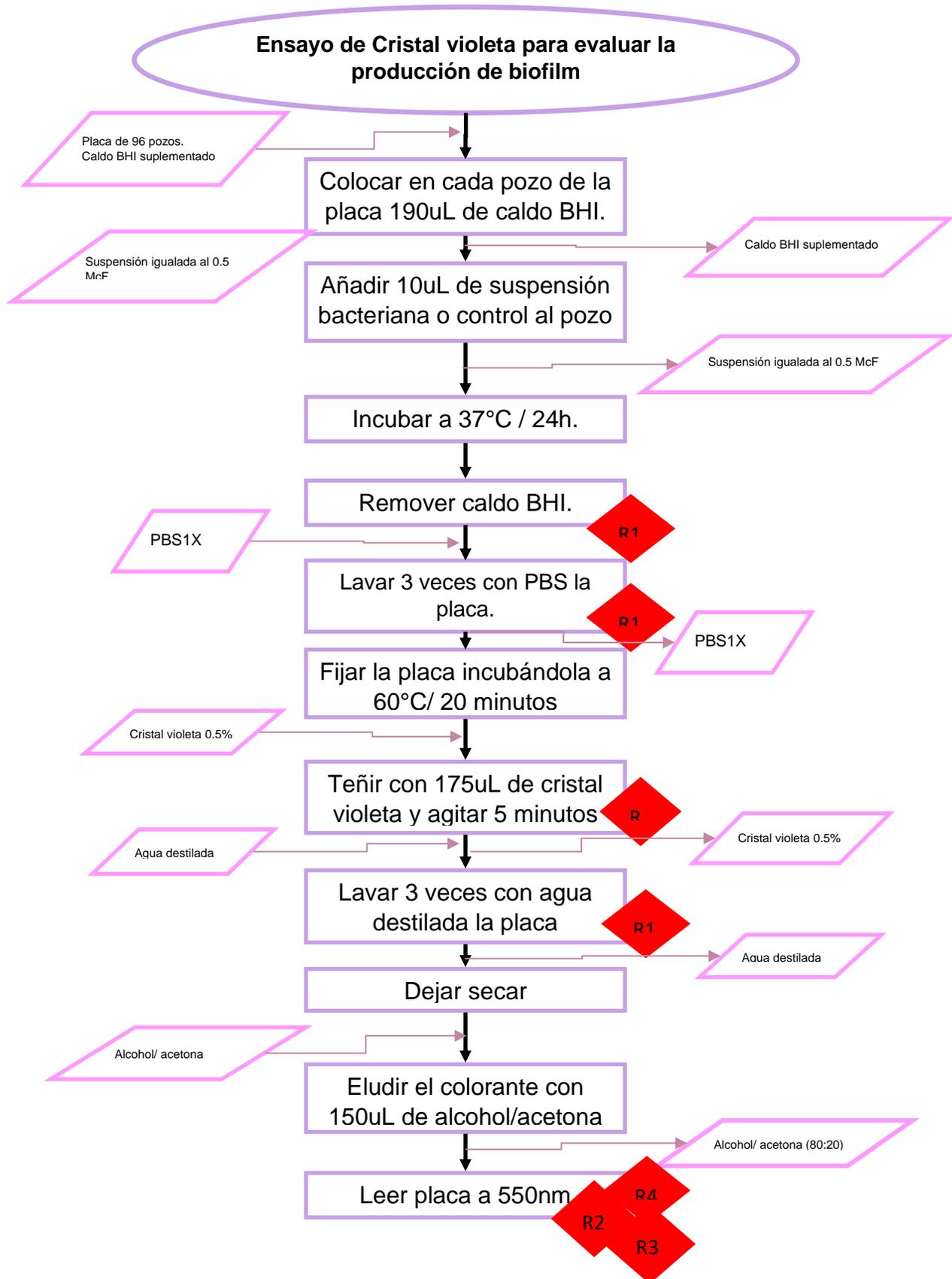
Se presentan los criterios utilizados para la categorización de los niveles de producción de biofilm en aislados clínicos (referencia):

Densidad óptica de corte (ODcut) = promedio de las OD de control negativo + 3 veces la desviación estándar de las OD del control negativo.

1. Si la OD es menor o igual a la ODcut = El aislado no forma biofilm
2. Si la OD es mayor a la ODcut pero menor al valor de 2 veces ODcut = El aislado es débil formador de biofilm
3. Si la OD es mayor a 2 veces la ODcut pero menor al valor de 4 veces ODcut = El aislado es mediano formador de biofilm
4. Si la OD es mayor a 4 veces la ODcut = El aislado es fuerte formador de biofilm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	C+	C+	C+	C-	C-	C-	M1	M1	M1
B	M2	M2	M2	M3	M3	M3	M4	M4	M4	M5	M5	M5
C	M6	M6	M6	M7	M7	M7	M8	M8	M8	M9	M9	M9
D	M10	M10	M10	M11	M11	M11	M12	M12	M12	M13	M13	M13
E	M14	M14	M14	M15	M15	M15	M16	M16	M16	M17	M17	M17
F	M18	M18	M18	M19	M19	M19	M20	M20	M20	M21	M21	M21
G	M22	M22	M22	M23	M23	M23	M24	M24	M24	M25	M25	M25
H	M26	M26	M26	M27	M27	M27	M28	M28	M28	M29	M29	M29

Fig. 14 Plantilla de microplaca para ensayo de biofilm de *S. aureus*. B: Blanco, C+: control positivo, C-: control negativo, M: aislados clínicos de *S. aureus*.



RESULTADOS

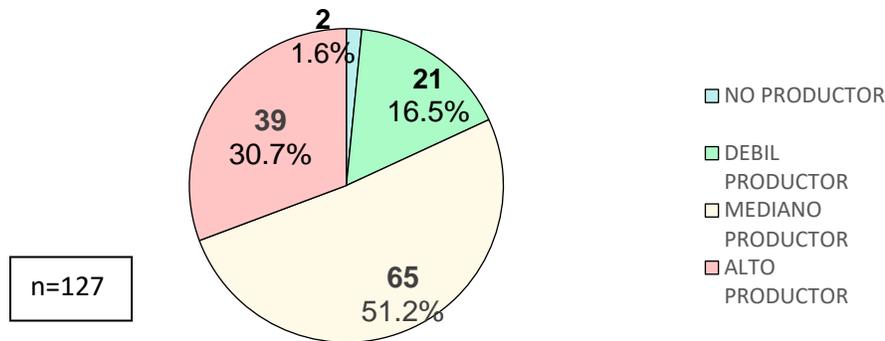
La propensión para formar biofilm *in vitro*, por las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de niños con DA del instituto de pediatría, presento el siguiente patrón de producción de biofilm.

Tabla 5 Resultados de producción de biofilm

Paciente	Zona anatómica seguida	Grado de producción de biofilm				Total de aislados
		No productor	Bajo productor	Mediano productor	Alto productor	
4	CD con lesión		4	6		10
	CI con lesión			3		3
	AI sin lesión			1		1
	AD sin lesión		6	5		11
	Narina		3	5		8
9	RD con lesión	1	1	7	4	13
	AI sin lesión			7	5	12
	Narina		1	5	6	12
26	CI con lesión			2	10	12
	Narina		1	5	2	8
	AD sin lesión				3	3
16	CD con lesión			9	3	12
	AD sin lesión		2	4	2	8
	Narina	1	3	6	4	14
Total		2	21	65	39	127

CD. Codo derecho, CI. Codo izquierdo AI. Antebrazo izquierdo, AD. Antebrazo derecho

GRAFICA 1 GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE AISLADOS DE *S. aureus*, DE PIEL DE NIÑOS CON DA



Descripción de resultados por aislados. –

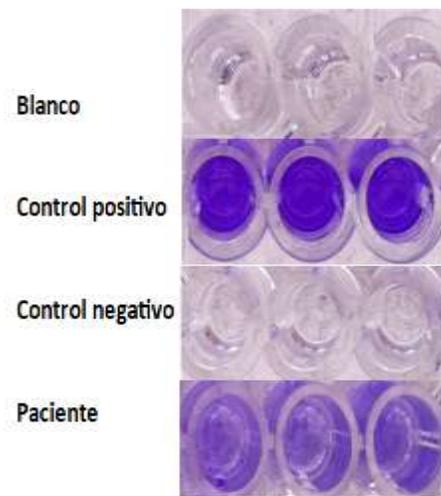
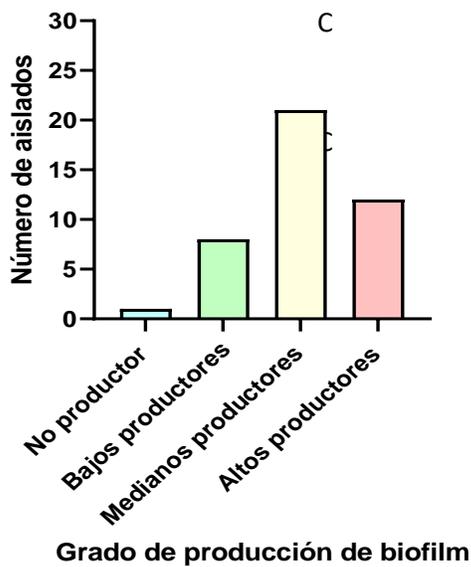
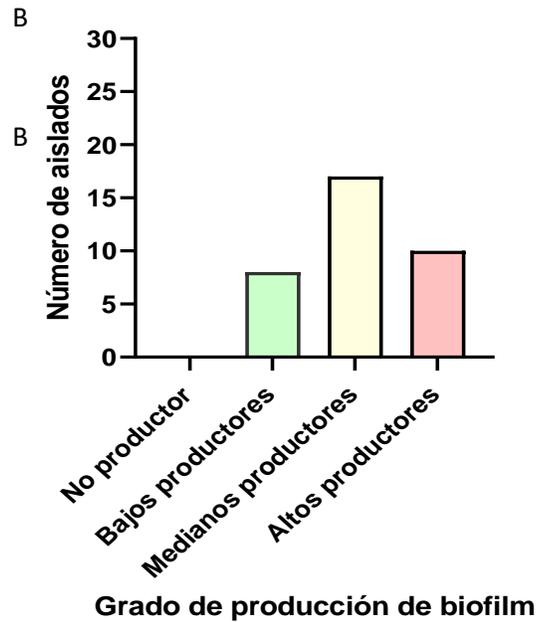
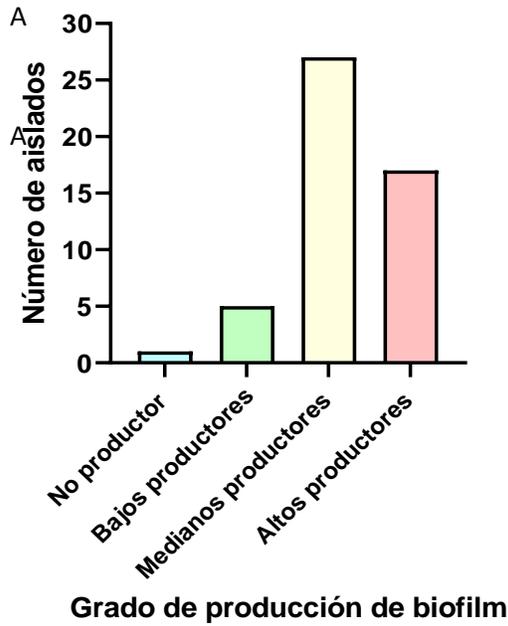
En el grupo de aislados trabajados 127, 1.6% (2 aislados) son no productores de biofilm, 16.5% (21 aislados) son débiles productores de biofilm, 51.2% (65 aislados) medianos productores de biofilm, y 30.7% (39 aislados) altos productores de biofilm.

La distribución del grupo de aislados de *S. aureus* se divide en 3, **fosas nasales, piel lesionada, y piel no lesionada**, el 33.1% (42/127) de los cuales el 97.6 (41/42) producen biofilm, 39.4% (50/127) donde el 98% (49/50) producen biofilm, y 27.6% (35/127) en donde 100% producen biofilm respectivamente.

Entre las cepas productoras de biofilm aisladas en piel con lesión la prevalencia es 10.2% (5/49) bajos productores de biofilm, 55.1% (27/49) medianos productores de biofilm y 34.7% (17/49) altos productores de biofilm, en zona de piel sin lesión, 23% (8/35) bajos productores de biofilm, 49% (17/49) medianos productores de biofilm y 29% (10/35) altos productores de biofilm y en zona de nariz 19.5% (8/41) bajos productores de biofilm, 51.2% (21/41) medianos productores de biofilm y 29.3% (12/41) altos productores biofilm.

GRAFICA 2 GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE AISLADOS DE *S. aureus*, DE ACUERDO CON LA ZONA AISLADA EN LA PIEL DE NIÑOS CON DA

S.



- A. Grado de producción de biofilm en aislados de *S. aureus* en piel CON lesión de niños con DA.
- B. Grado de producción de biofilm en aislados de *S. aureus* en piel SIN lesión de niños con DA.
- C. Grado de producción de biofilm en aislados de *S. aureus* en narina

Descripción de los resultados por paciente. -

El paciente 4 presento un patrón de producción de biofilm de débil-mediano productor en las tres zonas trabajadas, en visita 3 de antebrazo derecho sin lesión y codo derecho con lesión dos aislados fueron débiles productores y un aislado mediano productor.

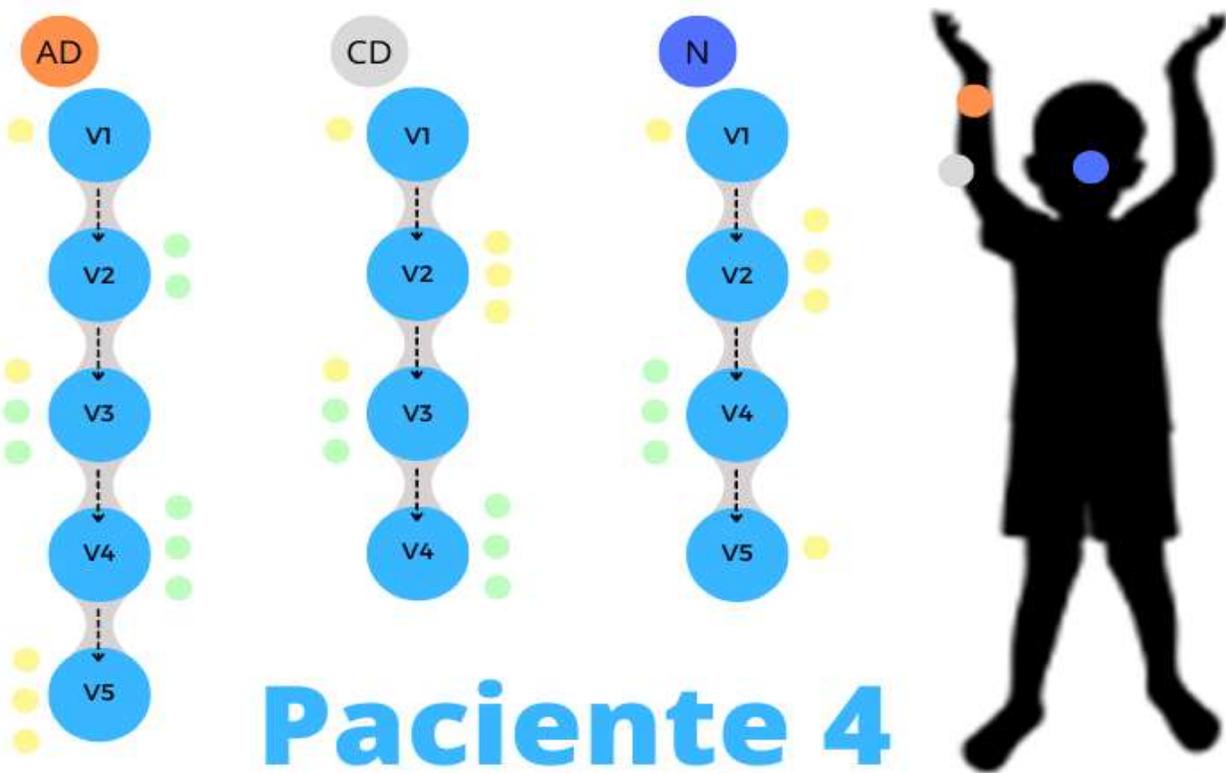


Fig. 15 Producción de biofilm por aislado, zona y visita del paciente 4

V: Visita ● No productor ● Bajo productor ● Mediano productor ● Alto productor AD: Antebrazo derecho
 CD: Codo derecho N: Narina

El paciente 9 Presento un patrón de producción de biofilm de mediano-fuerte productor en la mayoría de sus aislados de las zonas trabajadas, visita 1 de rodilla derecha con lesión, un aislado es débil productor y otro no productor, visita 3 de misma zona, se determinaron 2 altos productores y un mediano productor, visita 3 de antebrazo izquierdo sin lesión, dos fuertes productores un mediano productor, en la zona de narina se mostró un crecimiento diverso en todas las visitas, en la primera se encontraron alto, mediano y débil productores, en las siguientes visitas 2,3 y 5, dos altos productores y un mediano productor.

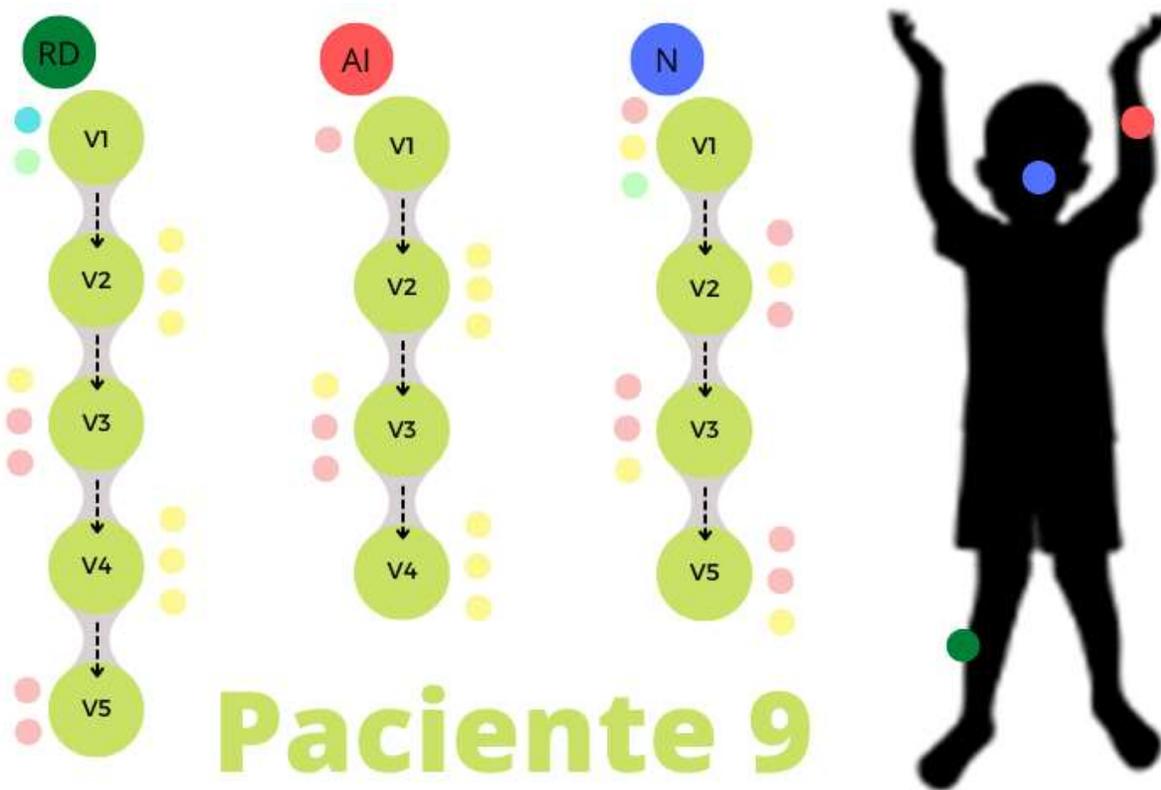


Fig. 16 Producción de biofilm por aislado, zona y visita del paciente 9.

V: Visita ● No productor ● Bajo productor ● Mediano productor ● Alto productor **RD: Rodilla derecho AI: Antebrazo izquierdo N: Narina**

Al paciente 26 se siguieron los aislados de codo izquierdo con lesión y se observó que en visita 1 y 3 hubo dos altos productores y un mediano productor, en la zona de narina, visita 1 creció un alto productor y un mediano productor, en visita 2 un bajo productor, un mediano productor y un alto productor, el patrón mostrado por los aislados fue de mediano-alto productor en la mayoría.

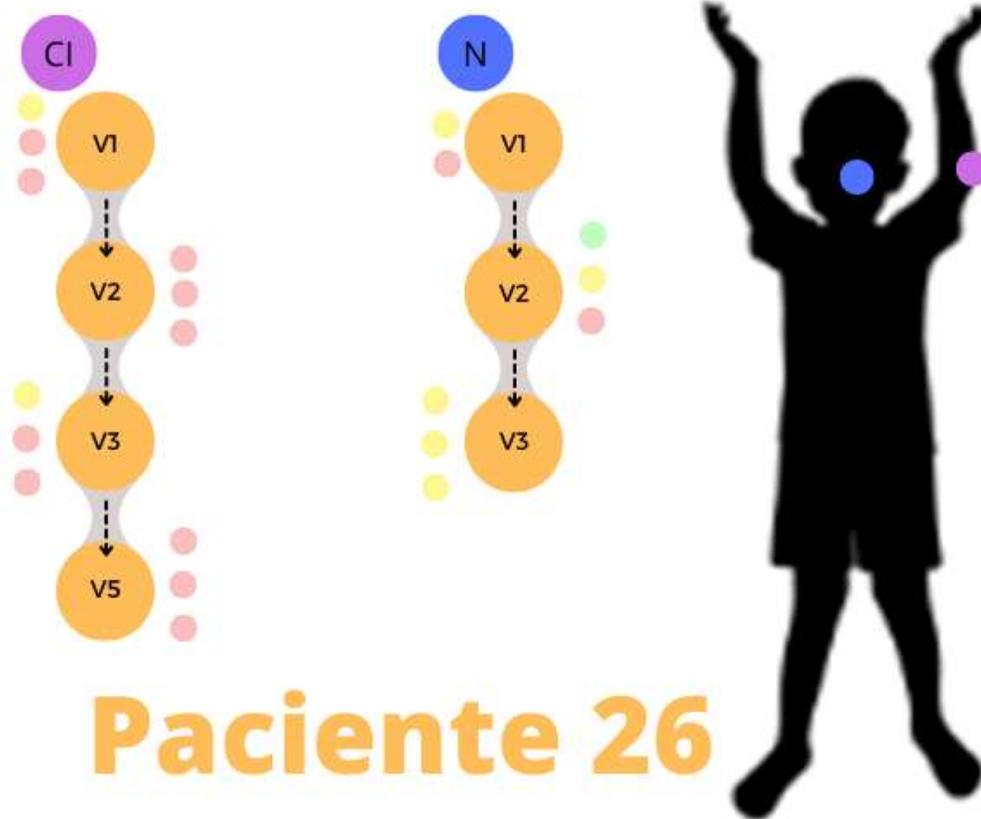


Fig 17 Producción de biofilm por aislado, zona y visita de paciente 26

V:Visita ● No productor ● Bajo productor ● Mediano productor ● Alto productor CI. Codo izquierdo N: Narina

El paciente 16 presento un patrón mediano-fuerte productor en la mayoría de sus aislados, en la zona de antebrazo derecho, se observó un patrón de producción distinto en todos los aislados, en la visita 1 hay un débil y un mediano productor, visita 2 dos fuertes y un mediano productor y en la visita 4 dos medianos y un débil productor, con respecto a la zona de narina en la visita 1 se encontraron dos medianos y un no productor, y en la visita 2 dos medianos y un fuerte productor.

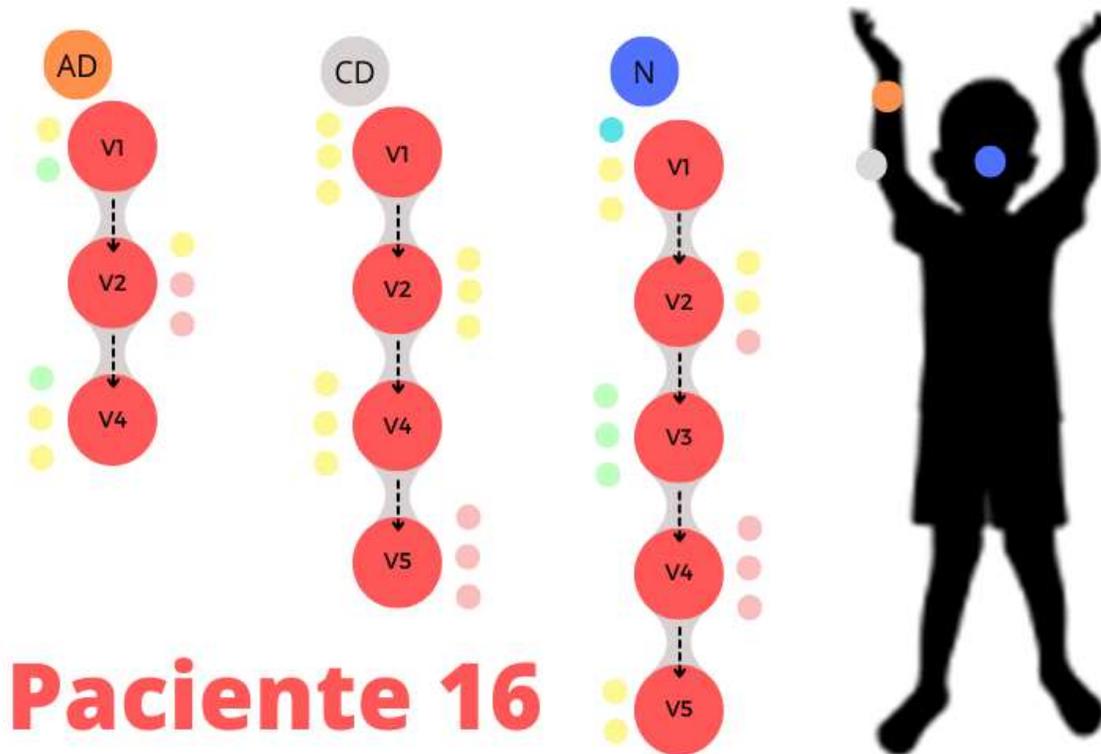
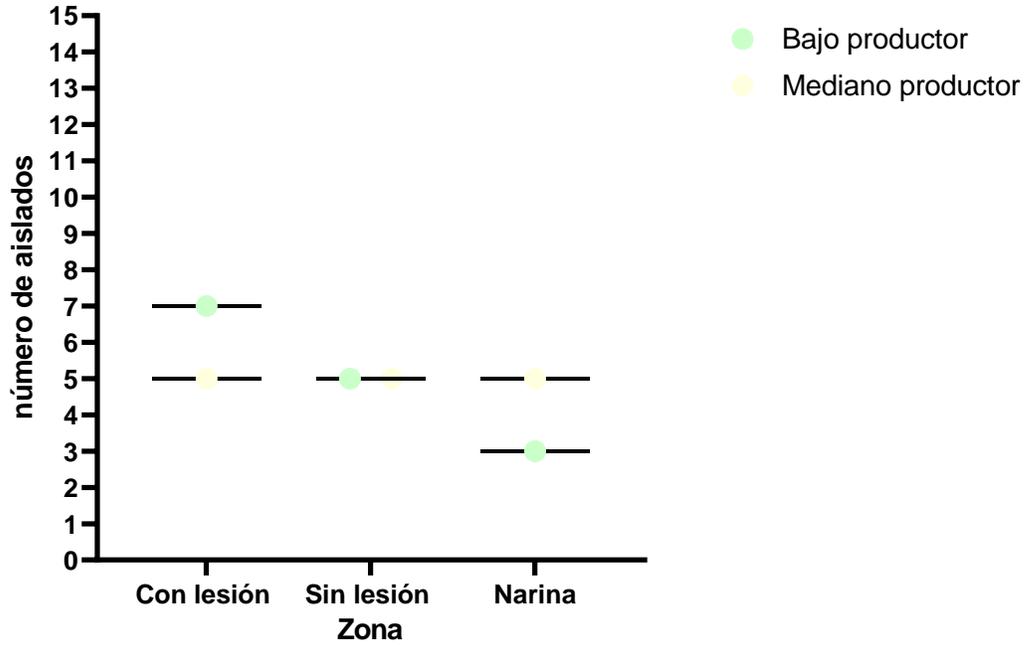


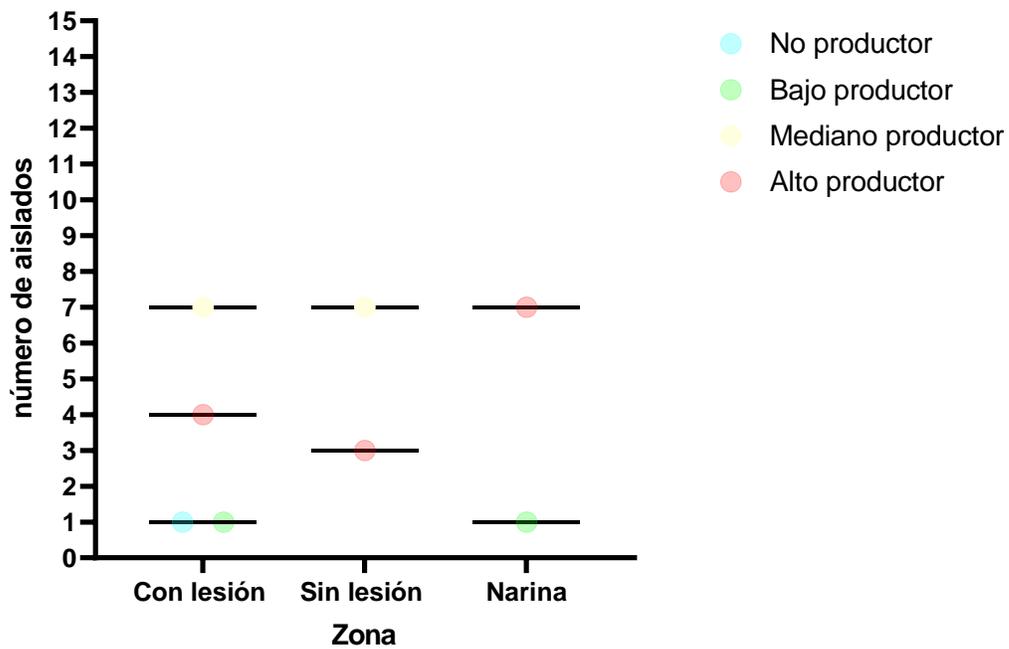
Fig. 18 Producción de biofilm por aislado, zona y visita del paciente 16.

V:Visita ● No productor ● Bajo productor ● Mediano productor ● Alto productor **AD: Antebrazo derecho**
CD: Codo derecho **N: Narina**

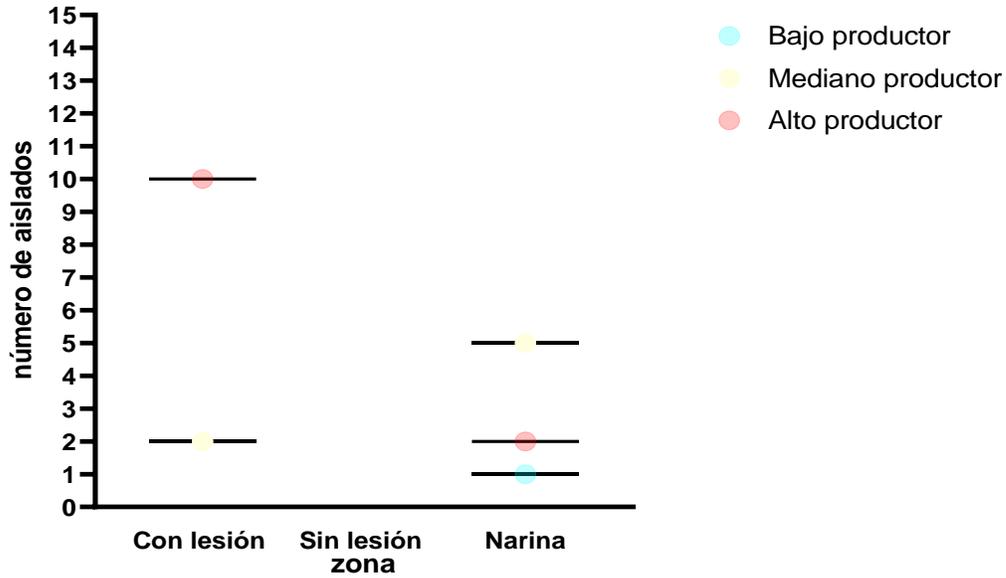
GRAFICA 3 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 9



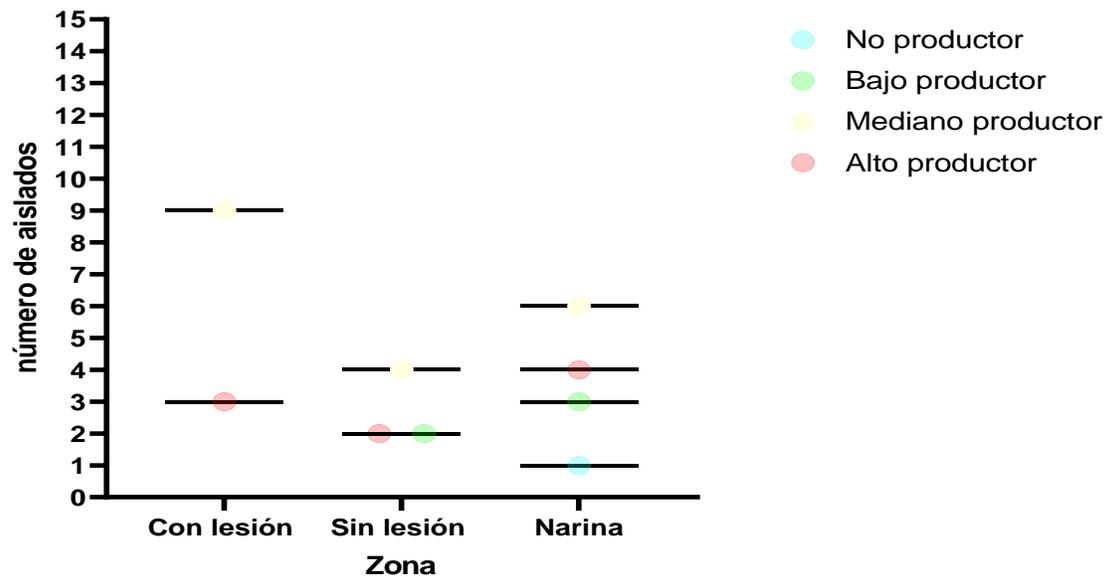
GRAFICA 4 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 9



GRAFICA 5 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 26



GRAFICA 6 RESULTADOS GENERALES DE GRADO DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM PACIENTE 16



DISCUSIÓN

Se analizó la capacidad de producir biofilm y el grado de producción en 127 aislados de *S. aureus* provenientes de zonas de piel con lesión, sin lesión y narinas de 4 niños con DA del INP.

En los 127 aislados trabajados se observó el patrón de mediano productor como el predominante (Grafica 1). El 1.6% de los aislados no produjo biofilm, concordando con la investigación de González y su grupo de trabajo, donde una de sus conclusiones fue que la presencia de *S. aureus* que coloniza a los pacientes con DA, preferentemente se produce en forma biofilm, permitiéndole generar mayor tolerancia a factores eliminadores y persistencia en el sitio (Gonzalez, 2017).

Los pacientes con DA tienden a tener una mayor prevalencia de colonización de *S. aureus*, y un alto número de cepas aisladas tienen la capacidad de formar biofilm en un patrón mediano-alto, y este patrón no solo se observó en aislados de zonas con lesión en las cuales se cree que el biofilm permite perpetuar el ciclo inflamatorio de la piel, el patrón se mantuvo tanto en zonas sin lesión y narinas siendo esta última zona muy importante, las narinas son el reservorio por excelencia de *S. aureus* y estas representarían una fuente potencial para infectar a pacientes con DA (Franco, 2010).

Con estos datos se podría descartar la hipótesis “A mayor lesión mayor presencia de biofilm” y plantear una nueva hipótesis de dispersión de *Staphylococcus aureus* en los niños con DA. Las narinas representan un reservorio donde se encuentra *S. aureus* que forma biofilm, este puede infectar una zona sin lesión en la piel de un paciente con DA, con el paso del tiempo el desarrollo de la bacteria podría conducir a las lesiones cutáneas y al conocido fenotipo de inflamación que perpetua *S. aureus* cuando coloniza a pacientes con DA. Por tanto, se pueden aislar cepas que producen biofilm en zonas sin lesión, narinas, inclusive un mayor grado de producción en estas zonas que en las lesionadas, a causa de los factores

ambientales que podemos encontrar en una u otra. Por ejemplo, una cepa de *S. aureus* debe ser más patógena para poder colonizar un sitio sano que uno dañado.

Los datos obtenidos arrojan el grado de producción de biofilm no tiene correlación con la intensidad de la DA, como se podría creer, zona con lesión y zona sin lesión existe una prevalencia similar de producción de biofilm en las cepas trabajadas, 34.7% y 29% de biofilm respectivamente.

Algo importante a considerar son las diferencias ambientales que existen entre los sitios de aislamiento, aunque se clasifique las zonas con lesión o sin lesión las condiciones ambientales de la rodilla no son similares a las del antebrazo por ejemplo, en el grupo de pacientes trabajados se cuenta con dos a los cuales se les hisoparon las mismas zonas, paciente 4 y 16, las áreas muestreadas son codo derecho con lesión, antebrazo derecho sin lesión y nariz, el paciente 4 pertenece al grupo de pacientes que presentó una mejoría al recibir tratamiento, y su patrón de producción es bajo-mediano productor (Grafica 3) , en cambio el paciente 16 pertenece al grupo de pacientes que no presentó mejoría y su patrón es mediano-alto productor (Grafica 6), con estos datos se puede pensar que la gravedad de la dermatitis si se podría ver apoyada por la producción de biofilm de *S. aureus* solo que al no comparar zonas anatómicas iguales, el grado de producción podría variar por las condiciones ambientales intrínsecas y extrínsecas de la zona (Allen,2014).

El biofilm es la forma en que colonizan la mayoría de los *Staphylococcus* en la piel no solo *S. aureus*, debido a que la piel es una zona altamente desafiante, por las fluctuaciones ambientales a las que son sometidas los habitantes y a su vez es la principal barrera de protección para el cuerpo contra el exterior, las bacterias para sobrevivir deben adaptarse y el biofilm es un factor de virulencia muy importante para lograrlo. *S. aureus* cuenta con un arsenal de factores de virulencia para causar daño, no solo el biofilm de esta manera una cepa productora de biofilm puede mantenerse y persistir, pero si no cuenta con otros factores de patogenicidad muy posiblemente no podrá causar daño, y es posible aislar cepas altas productoras en

zonas donde no existe lesión o en pacientes que mostraron una mejoría al tratamiento (Di Domenico, 2019).

Por otra parte, algo que llamo la atención es la heterogeneidad de producción de biofilm que se observó en algunos pacientes entre sus aislados en la misma zona y visita, desde 2017 el doctor Rafael Peña Miller evidencio el dogma central de la microbiología establece que en un medio ambiente constante y homogéneo, bacterias genéticamente idénticas expresan el mismo fenotipo. No se cumplía estrictamente debido a avances tecnológicos se puede observar que poblaciones clonales de bacterias pueden estar compuestas de distintas subpoblaciones, cada una expresando un fenotipo diferente. Esta heterogeneidad fenotípica les permite a las comunidades microbianas realizar tareas complejas mediante la implementación de estrategias cooperativas de división de trabajo, así como sobrevivir a medios ambientes hostiles e impredecibles utilizando estrategias de apuesta-cobertura (Peña, 2017).

De esta forma una infección provocada por múltiples subpoblaciones distintas puede hacer o no más compleja su resolución, algunas bacterias pueden ser patógenas y otras no, algunas pueden ser sensibles al antibiótico utilizado y otras no, y con los datos de este trabajo, algunas bacterias pueden ser más tolerantes que otras, permitiéndoles evadir sistemas de eliminación y persistir.

Actualmente los estudios revisados en la literatura se basan únicamente en la producción de biofilm, algunos estudios como el de Allen et al. (2014) estudian el biofilm in situ a través de técnicas de microscopia evaluando características del biofilm como grosor, viabilidad de colonias, organización y distribución, para correlacionar estas características dependiendo el grado de lesión presentado, encontrando que en zonas con lesión se observan biofilm más gruesos de *S. aureus* (Allen, 2014).

Otros estudian cualitativamente al biofilm por técnicas en caja Petri como rojo Congo y métodos de adherencia en tubo observando la presencia y la correlación con

ensayos de resistencia a antibióticos para observar si existe una relación entre resistencia y producción a biofilm, Senobar en 2021, no encontró relación entre estos factores, en su estudio se detectó el biofilm con mayor frecuencia en aislamientos de MSSA y MRSA ($p < 0,0001$ y $p = 0,0018$ para MSSA, $p = 0,02$ y $p = 0,015$ para MRSA, respectivamente) (Senobar, 2021).

Sin embargo otros estudios correlacionan la producción del biofilm con la resistencia a antibióticos como el descrito por E. G. Di Domenico en 2018 donde se estudió niños con distintos fenotipos de DA en cuanto a SCORARD, evaluando el biofilm por la misma técnica realizada en este trabajo, reportaron que para pacientes con una dermatitis severa existían mayores aislamientos de altos productores de biofilm, y también encontraron que al hacer la susceptibilidad a antimicrobianos por la técnica de concentración mínima inhibitoria la mayoría de las cepas fueron sensibles a los antibióticos, pero al evaluar la susceptibilidad por la técnica de anti biofilm-test (ABT) las cepas ahora resultaron resistentes a los antibióticos, relacionando la producción de biofilm con la tolerancia a antibióticos y la necesidad de concentraciones más altas u mayor tiempo de exposición al agente para erradicar las cepas productoras de biofilm (Di Domenico, 2018). Otros estudios identifican presencia o ausencia de genes que codifican componentes importantes para la producción de biofilm, como IcaADBC (Rohde, 2001).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Leszek Blicharz y su grupo de trabajo, al evaluar la propensión a formar biofilm en pacientes con DA, encontraron en zonas con lesión 76,3 % (29/38), sin lesión 48,5 % (16/33) y narinas 79,1 % (34/43), existía la misma incidencia a formar biofilm y no se encontró correlación entre lesión y grado de producción de biofilm, otra similitud entre los resultados fue la colonización en las narinas aunque únicamente evaluaron débiles productores de biofilm y altos productores de biofilm, y nosotros evaluamos 4 grados de producción de biofilm, que nos permite tener un panorama más certero.

Algo importante a destacar es que en el estudio que realizamos se evaluaron distintas clonas de un mismo sitio en distintas visitas, esto permitió observar el

comportamiento de las cepas a través del tiempo en un estudio longitudinal a comparación de lo descrito en las referencias que solo se basan en una población homogénea, contemplando la heterogeneidad de cepas que puede haber en un mismo sitio.

Este estudio permitió clasificar el grado de biofilm de las cepas, por una técnica metodológicamente asequible y conocer si los aislados producen biofilm de una manera cuantitativa, además de que se trabajaron distintos aislados la técnica más empleada para evaluar este hecho es una técnica que presenta algunas limitaciones cuando hablamos de tipos de biofilm que una bacteria puede producir, la técnica de cristal violeta permite el estudio del biofilm basado en exopolisacáridos (Nguyen, 2020), no se conocen las características de la cepa pero apoyar en un futuro este estudio con la determinación de IcaADBC por PCR nos permitiría saber el tipo de biofilm que produce la bacteria y si la determinación del grado de producción de biofilm es el adecuado (Di Domenico, 2018).

Otra limitante al estudio fue el número de aislados trabajados por pacientes se redujo a 3 y en algunos casos no se contaba con los tres aislados, una población más homogénea entre número de aislados y zonas podría permitir una mejor correlación de los datos y un panorama más certero entre grado de producción de biofilm y gravedad de la dermatitis.

Pese a las limitantes el estudio brinda un panorama y una construcción de línea de trabajo clara sobre el grado de producción de biofilm en pacientes con dermatitis atópica y a su vez pone en manifiesto la importancia de la heterogeneidad de cepas y la colonización de *S. aureus* en las fosas nasales importantes para evitar y tratar infecciones de *S. aureus* en pacientes con DA.

CONCLUSIONES

Se determino el grado de producción de biofilm de los 127 aislados trabajados, clasificándolos en altos, medianos, bajos y no productores de biofilm, la mayoría de los aislados son medianos productores 51.2% (65/127).

- Se cuantifico la producción de biofilm de los aislados de *S. aureus* por medio de la técnica de cristal violeta en placa.
- Se determino que si existe una relación entre la presencia de biofilm de *S. aureus* y la colonización de pacientes con DA que forman biofilm preferentemente, 98.4 % (125/127) producen biofilm.
- Los resultados obtenidos no correlacionan el grado de producción de biofilm con la gravedad de la DA, el biofilm es un determinante de patogenicidad importante para la colonización y la persistencia en sitios, se requieren de otros factores de virulencia para causar daño como lo son enterotoxinas, proteínas de evasión a la respuesta inmune, genes de resistencia a antibióticos, entre otros.
- Se observo heterogeneidad de producción de biofilm, lo que permite deducir que una misma región anatómica de encuentra subpoblaciones distintas de *S. aureus* colonizando.
- Los hallazgos de *S. aureus* en narinas permiten generar hipótesis de infección partiendo de que la zona de narinas podría ser el foco principal de infección para pacientes con DA.



ANEXOS

ANEXO 1 REACTIVOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE CRISTAL VIOLETA

Reactivo	Forma de preparación
Caldo BHI suplementado con Glucosa (222.2nM), Sacarosa (116.9nM), NaCl (1000nM)	Pesar BHI 37g /L Glucosa 40.09g/L Sacarosa 40.01g/L NaCl 58.44g/L -Colocar en tubos falcon de 50mL y esterilizar a 121°C/10lb/10minutos
Cristal violeta 0.5%	Medir 5mL/L -Colocar en tubos falcon de 50mL y refrigerar
Solución salina fisiológica 0.9% (SSF)	Pesar 9g NaCl/L Dispensar un volumen de 4mL en tubos con tapa de 10mL y esterilizar 121°C/15lb/15 minutos
Alcohol-acetona 80:20	Medir 800mL de alcohol etílico 200mL de acetona -Colocar en tubos falcon de 50mL y refrigerar

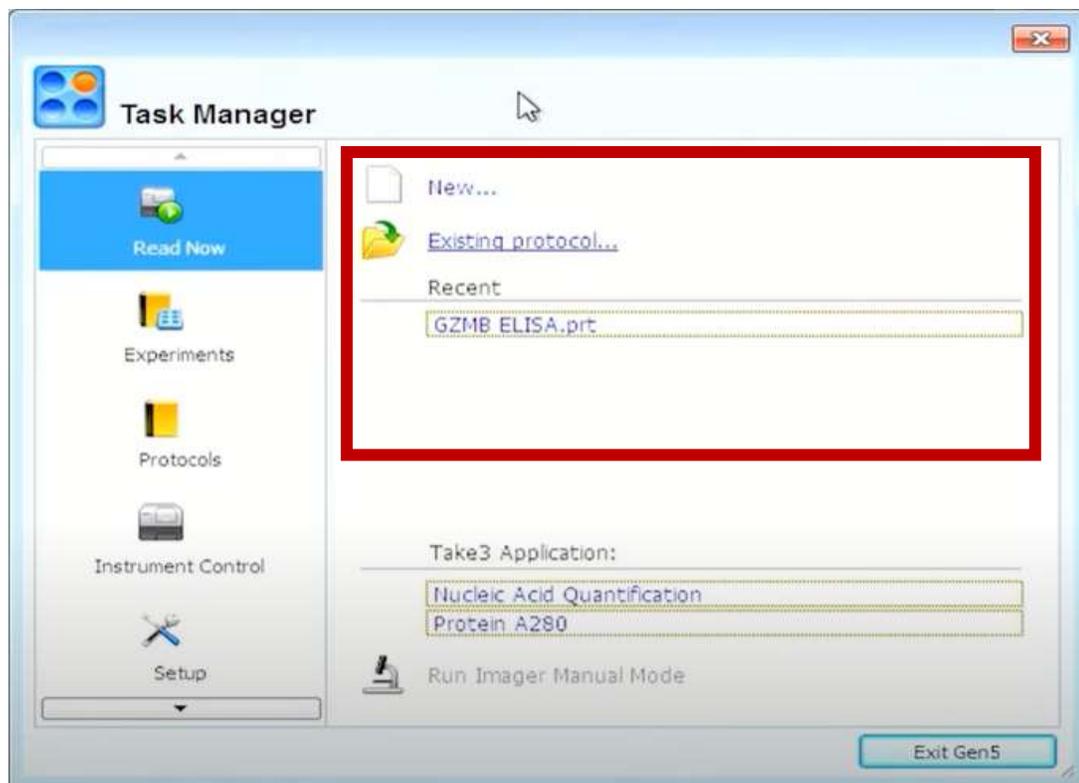
BHI: Infusión cerebro corazón, mL: mililitros, L: litros, g: gramos, nM: nanomolar, %: por ciento, lb: libras, °C: grados centígrados.

ANEXO 2 UTILIZACION DEL SOFTWARE Gen 5 Y EQUIPO EPOCH

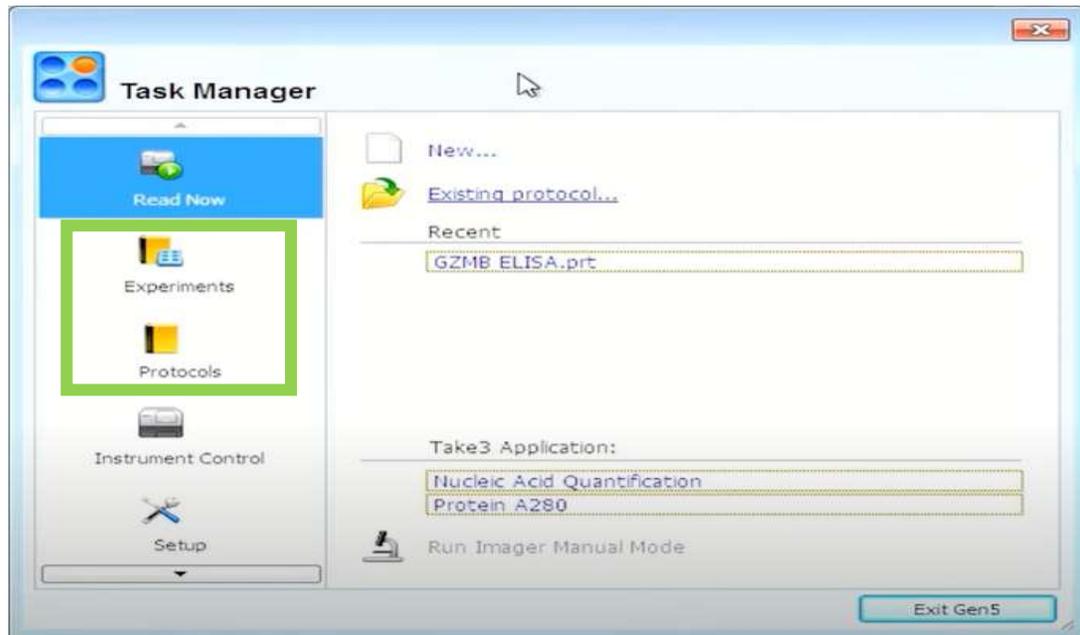
1. Conectar el equipo a la computadora a través del cable de interfaz
2. Encender computadora
3. Encender equipo presionando el interruptor en la parte inferior derecha y posteriormente el botón negro.
4. Entrar al software Gen 5 dando click en el siguiente icono en el escritorio.



5. De forma predeterminada el administrador de tareas se abre, con las opciones de nuevo experimento y los protocolos recientemente abiertos



6. De lado izquierdo se encuentran los experimentos y protocolos guardados para poder solo seleccionarlos y ejecutar.



7. Para generar un nuevo experimento solo se debe seleccionar "NEW"

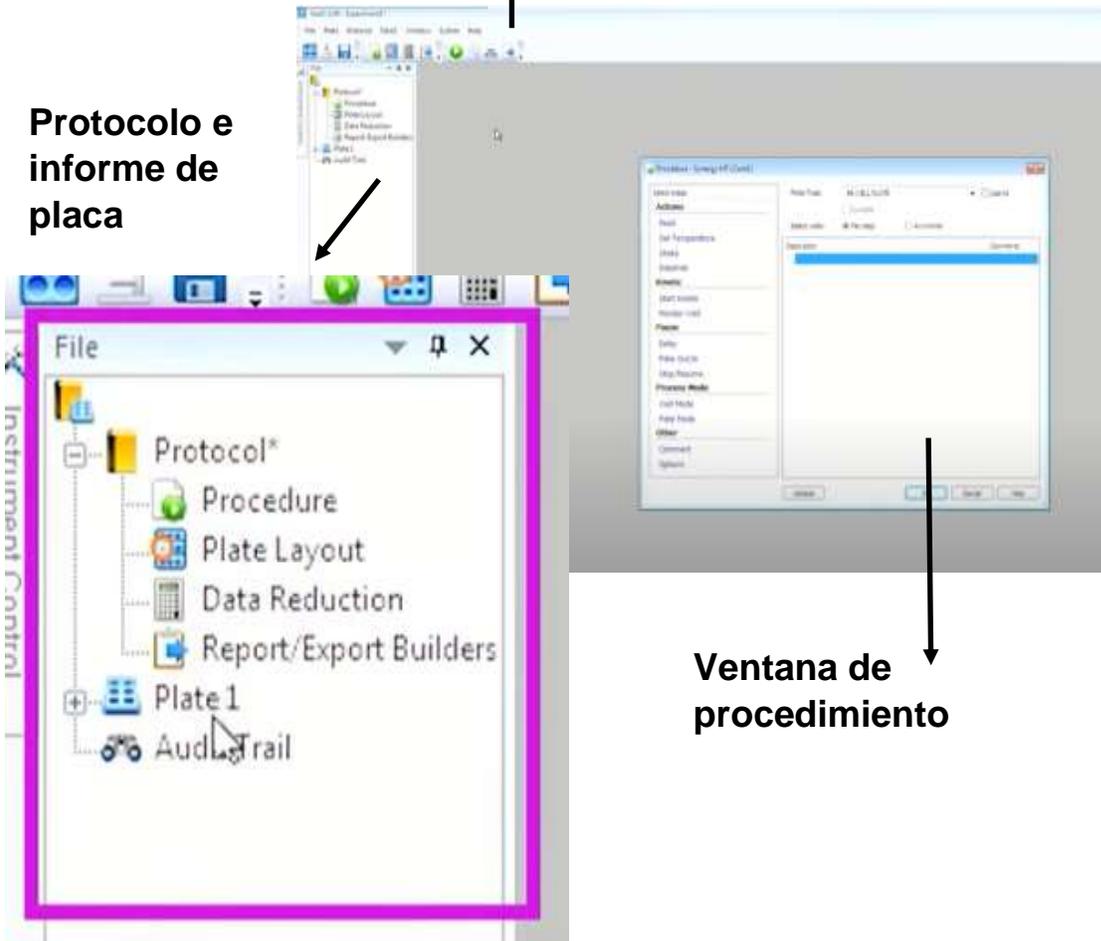


8. Se abre la siguiente pantalla



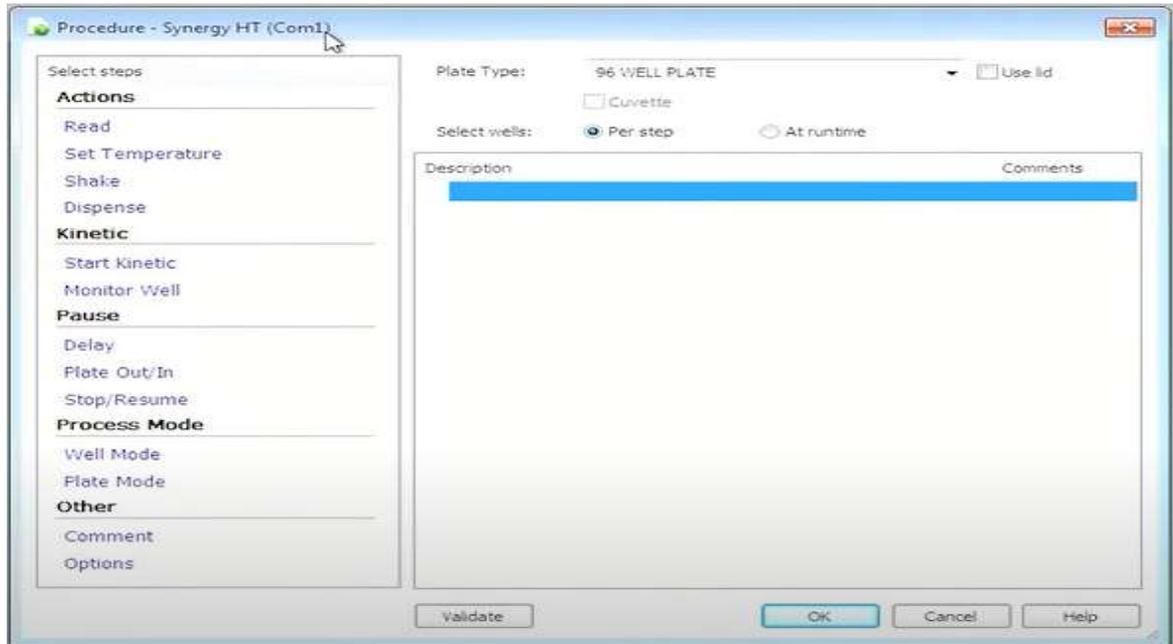
Menú y barra de

Protocolo e
informe de
placa

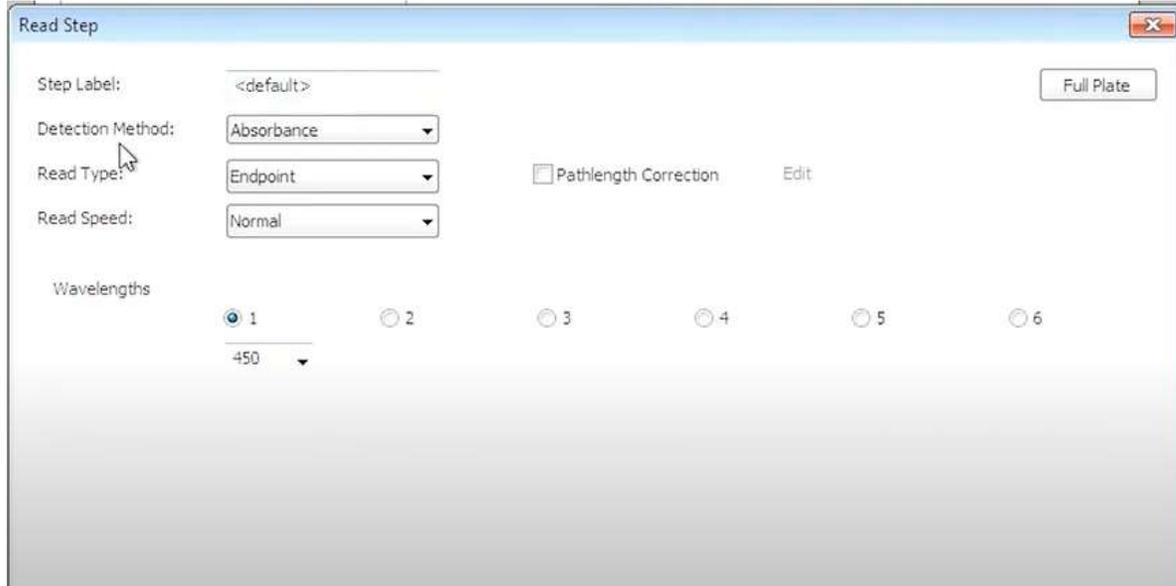


Ventana de
procedimiento

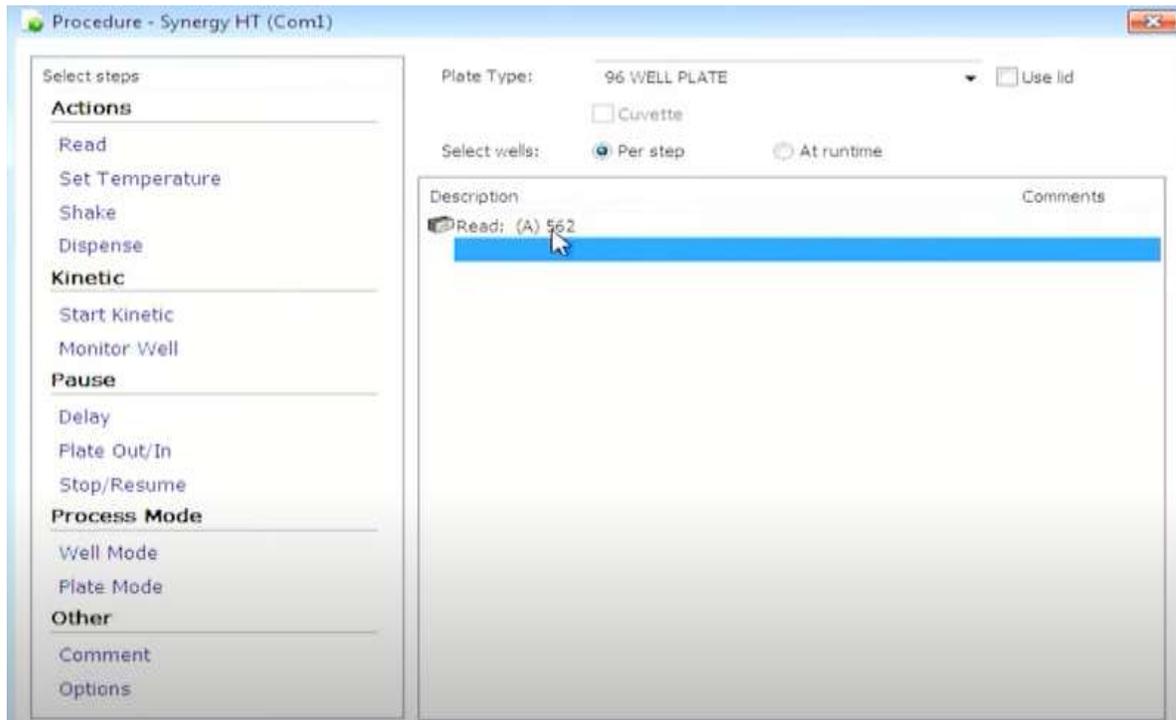
9. En la ventana de procedimiento se podrán seleccionar las características del experimento como tipo de placa, para este experimento la placa utilizada es 96 pozos.



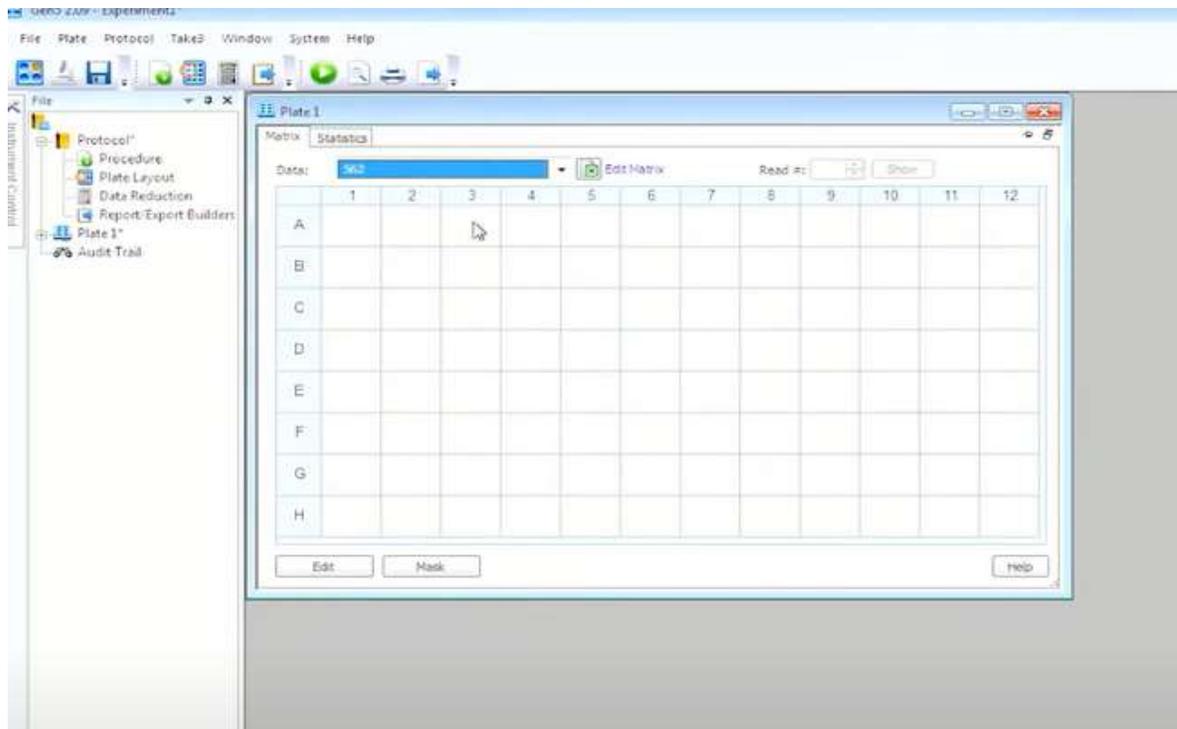
10. Presionar Read y se desplegará una opción con otras condiciones para el experimento se debe seleccionar absorbancia, punto final, y solo una longitud de onda a 550nm y en la opción de Step label colocar un nombre referente que en nuestro caso fue **Biofilm Staph 550** y seleccionamos OK



11. El protocolo aparecerá en la ventana de procedimiento y se seleccionará ok de nuevo.



12. Se abrirá la siguiente pantalla



13. El usuario procederá a colocar la placa en el soporte del equipo tomándola por el centro, evitando en todo momento tocar la base de esta, deberá observar que la posición sea la correcta, y presionará ok y se comenzará la lectura.

14. Tomar foto a los resultados y dar click en la parte en cancelar la exportación de resultados.

Matrix Statistics

Data: **Biofil Stach:350** Edit Matrix Read #: Show

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.095	0.101	0.141	3.144	2.574	2.411	0.117	0.102	0.100	0.041	0.039	0.049
B	0.039	0.089	0.107	0.131	0.113	0.108	0.136	0.117	0.125	0.149	0.040	0.046
C	0.039	0.224	0.342	0.323	0.367	0.335	0.357	0.386	0.454	0.366	0.040	0.039
D	0.040	0.209	0.331	0.350	0.342	0.391	0.380	0.284	0.229	0.203	0.040	0.049
E	0.049	0.227	0.339	0.325	0.360	0.446	0.459	0.398	0.400	0.372	0.040	0.046
F	0.039	0.253	0.294	0.270	0.057	0.057	0.057	0.060	0.060	0.079	0.048	0.049
G	0.057	0.048	0.048	0.049	0.049	0.049	0.051	0.050	0.049	0.048	0.050	0.049
H	0.066	0.063	0.048	0.048	0.048	0.048	0.056	0.049	0.049	0.052	0.047	0.049

15. Una vez que se quiera realizar una nueva lectura será suficiente con seleccionar el protocolo ya guardado.

REFERENCIAS

1. Abraham, N., y Jefferson, K. (2012). *Staphylococcus aureus* protein mediates biofilm formation in the absence of calcium. *Microbiology*. 158(38). 1504–1512.
2. Allen, H.B., Vaze, N.D., Choi, C., Hailu, T., Tulbert, B.H., Cusack, C.A., y et al. (2014). The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis. *JAMA Dermatol*. Mar;150(3). 260–265.
3. Archer, N., Mazaitis, M., Costerton, J., Leid, J., Powers, M., y Shirliff, M.(2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. ;2:445–459.
4. Armengot, M., Hernández, A., y Torrelo, A. (2015). Filagrina: papel en la barrera cutánea y en el desarrollo de patología. *Actas Dermosifiliogr*. 106(2).86-95.
5. Blicharz, L., Michalak, M., Szymanek-Majchrzak, K., Młynarczyk, G., Skowroński, K., Rudnicka, L., y Samochocki, Z. (2020). The Propensity to Form Biofilm in vitro by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares of Patients with Atopic Dermatitis: Clinical Associations. *Dermatology*, 1–7. doi:10.1159/000511182.
6. Blicharz, L., Rudnicka, L y. Samochocki, Z. (2019). *Staphylococcus aureus*: an underestimated factor in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Postepy Dermatol Alergol*. 36(1): 11–17.
7. Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). *Alpha-Toxin Is Required for Biofilm Formation by Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 185(10), 3214–3217. doi:10.1128/jb.185.10.3214-3217.2003
8. Chien, Y., Manna, A. C., Projan, S. J., & Cheung, A. L. (1999). *SarA, a Global Regulator of Virulence Determinants in Staphylococcus aureus, Binds to a Conserved Motif Essential for sarA-dependent Gene Regulation*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37169–37176. doi:10.1074/jbc.274.52.37169

9. De Benedetto, A., Agnihotri, R, McGirt LY., Bankova, LG., y Beck, LA. (2009). Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol.*129:1
10. Dengler, V., Foulston, L., S. DeFrancesco, A., Losick, R.(2015). An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology.* 197:3779–3787
11. Di Domenico, e., Cavallo, I., Bordignon, V., Prignano, G., Sperduti, I Gurtner, A., Trento, E., Toma, L., Pimpinelli, F., Capitano, B., y Ensoli, F. (2018). Inflammatory cytokines and biofilm production sustain *Staphylococcus aureus* outgrowth and persistence: a pivotal interplay in the pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Nature. Sci Rep* 8, 9573 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27421-1>
12. Di Domenico, E., Cavallo, I., Capitano, B., Ascenzioni, F., Pimpinelli, F., Morrone, A., y Ensoli, F. (2019). *Staphylococcus aureus* and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Microorganisms.* 7(9).301.
13. Donlan, M. (2015). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect.* 8 (9). 881-90.
14. Dunman, PM., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S, et al. (2001). Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol.* 183:7341 - 7353; PMID: 11717293;
15. Franco, M., Motta, A., y Mendoza, N. (2010). *Staphylococcus aureus*: sensibilidad y resistencia a los antibióticos en una muestra de pacientes con dermatitis atópica. *AsoColDerma.* 18(4). 189-195.
16. Foulston, L., Elsholz, A., Defrancesco, A., y Losick, R. (2014). The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *MBio* 5, e01667–e01614. 10.1128/mBio.01667-14

17. Gonzalez, T., Biagini, J., Herr, A., y Khurana.(2017). Staphylococcal Biofilms in Atopic Dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.*17(81). 1-11.
18. Groos, M., Cramton, S., Götz, F., y Peschel, A.(2001). Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect Immun.* 69(5). 3423–3426.
19. Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P., y Herrmann, M.(2005). sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology.* 151(6).1789–1800.
20. Heilmann., C.(2003).Molecular basis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. In *Medical Implications of Biofilms* (Wilson M. Devine D.Eds.), Vol. 1.110–135.
21. Jan, J., García, E., Rodríguez, S., Cancino, M., y Cancino, J. (2017). Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *INTECH.* 10. <http://dx.doi.org/10.5772/65976>
22. Jihyun, K., Byung, K., Kangmo, A., y Donald, L. (2019). Interactions Between Atopic Dermatitis and *Staphylococcus aureus* Infection: Clinical Implications. *Allergy Asthma Immunol Res.* 11(5).593-603.
23. Joo H.S., Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol.* 2012;19(12):1503–1513
24. Kaufman BP, Guttman-Yassky E, Alexis AF. Dermatitis atópica en diversos grupos raciales y étnicos-Variaciones en epidemiología, genética, presentación clínica y tratamiento . *Exp. Dermatol* . 2018; 27 :340–357
25. Kim, M.D., Byung, M.D., y Donald, M.D.(2019). Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Proc.* 40(2). 84-92.
26. Kirmusaoğlu, S. (2016). Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. *INTECH.* <http://dx.doi.org/10.5772/62943>

27. Kullik, I., & Giachino, P. (1997). *The alternative sigma factor σB in Staphylococcus aureus: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock*. *Archives of Microbiology*, 167(2-3), 151–159. doi:10.1007/s002030050428
28. Limoli, D., Jones, C., y Wozniak, D. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr.* 3(3). 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
29. Listery, J., y Horswill, A. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol.* 4. 178.
30. Liu, H., Shang, W., Hu, Z., Zheng, Y., Yuan, J., Hu, Q., ... Yang, Y. (2018). A novel SigB(Q225P) mutation in *Staphylococcus aureus* retains virulence but promotes biofilm formation. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1). doi:10.1038/s41426-018-0078-1
31. Marron, S. E., Cebrian-Rodriguez, J., Alcalde – Herrero, V. M., Garcia – latasa de aranibar, F.J., y Tomas – Aragones, L. (2020). **Psychosocial** Impact of Atopic Dermatitis in Adults: A Qualitative Study. *Actas Dermo-Sifiliográficas*.111(6). 513-517.
32. Marquina, D., Y Santos, A. (2010). Procesos biológicos regulados por quorum sensing. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología. 3 (5): 56-74.
33. Mateos, M. (2011). Guía de tratamiento de la dermatitis atópica en el niño. 2.ª edición. Documento de Consenso Grupo de Expertos. Madrid. Ergon.
34. Mootz, J., Benson, M., Heim, C., Crosby, H., Kavanaugh, J., Dunman, P., Kielian, T., Torres, V., y Horswill, A. (2015). Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Molecular microbiology*. 96(2).388–404.
35. Mootz, J., Malone, C., Shaw, L., y Horswill, A.(2013) Staphopains modulate *Staphylococcus aureus* biofilm integrity. *Infection and immunity* .81(9). 3227–3238.
36. Moormeier, D., y Bayles, K. (2017). *Staphylococcus aureus* Biofilm: A Complex Developmental Organism. *Mol Microbiol.* 104(3). 365–376.

37. Moormeier, D., Endres, J., Mann, E., Sadykov, M., Horswill, A., y Rice, C. (2013). Use of microfluidic technology to analyze gene expression during biofilm formation reveals distinct physiological niches. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(23).3413–3424.
38. Nakatsuji, PhD., y Gallo, R. (2019). The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *American College of Allergy, Asthma & Immunology.* 122(3). 263-269.
39. Nazar, J. (2015). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol.* 67(2). 61-72.
40. Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., Y Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3324-3334. doi:10.1016/j.csbj.2020.10.027
41. Ortega, S; y Hernández, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Permanyer. Bol Med Hosp Infant Mex.* 2018;75:79-88. DOI: 10.24875/BMHIM.M18000012.
42. Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine.* 64(26). 175-188.
43. Paharik, A., y Horswill, A. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr.* 4(2). 13-19.
44. Peña, R. (2017). Heterogeneidad en poblaciones genéticamente idénticas de bacterias: modelos matemáticos y experimentales. Instituto de ciencias físicas. UNAM.
45. Pérez, L., Zegpi, S., y Sáenz, L. (2014). ATOPIC DERMATITIS. *REV. MED. CLIN. CONDES;* 22(2) 197-203.
46. Pratten, J. , Foster, SJ , Chan, PF , Wilson, M. y Nair, SP (2001) Expresión de reguladores accesorios de Staphylococcus aureus dentro de biopelículas y efecto sobre la adhesión . *Los microbios infectan* 3 : 633 – 637 .

47. Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., Y Ziebuhr W. (2000). Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol*; 182:6824 - 6826; PMID: 11073930; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.23.6824-6.2000>
48. Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q., Mongaret, C., y C. Gangloff, S.C.(2016). *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field. DOI: 10.5772/66380
49. Rice, KC., Mann, EE., Endres, JL., Weiss, EC., Cassat, JE., Smeltzer, MS., Y et al.(2007) The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:8113 - 8118; PMID: 17452642.
50. Rohdee, H., Knobloch, J., Horstkotte, M., y Mack, D. (2001). Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC Genotype and Biofilm Expression Phenotype. *J Clin Microbiol*. 39(12). 4595–4596.
51. Ruiz, D. (2020). Microbioma cutáneo, disbiosis y su rol en dermatitis atópica. *Revista Médica Sinergia*. 5(2). 19-25.
52. Sadykov, M., y Bayles, W. (2012). The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Curr. Opin. Microbiol*. 15(20). 211–215.
53. Schilcher, K., y Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3). doi:10.1128/mnbr.00026-19
54. Schwartz, K., Syed, AK., Stephenson, RE., Rickard, AH., y Boles, BR. (2012) Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog* 8(6): e1002744. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002744>
55. Senobar, T., Stajer, A., Barra, I., Ostorhazi, E., Szabo, D., y GajdCS, m. (2021). Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant

- Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature. *Journals*. 2021:14 Pages 1155-1168.
56. Silverberg, J. I., Barbarot, S., Gadkari, A., Simpson, E. L., Weidinger, S., Mina-Osorio, P., & Eckert, L. (2021). *Atopic dermatitis in the pediatric population. Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 126(4), 417–428.
57. Singh, A. K., Prakash, P., Achra, A., Singh, G. P., Das, A., & Singh, R. K. (2017). Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of global infectious diseases*, 9(3), 93–101.
58. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T., y Geoghegan, J. (2014). Affiliations Protein-based Biofilm Matrices in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol*. 10;4:171. doi:10.3389/fcimb.2014.00171.
59. Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., y Okuda, K. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp Degrades Specific Proteins Associated with *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Host-Pathogen Interaction. *J Bacteriol*. 195(8). 1645–1655.
60. Thomas, V., y Hancock, L. (2009). Suicide and fratricide in bacterial biofilms. *Int. J. Artif. Organs*.32 (24), 537–544.
61. Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2003). *SarA and not σB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 48(4), 1075–1087. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x
62. Vaudaux P.E., Francois,P., Proctor,R.A., McDevitt, D., Foster,T.J., Albrecht, R.M., Lew, D.P., Wabers, H., Cooper, S.L. (1995). Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect. Immun*.63, 585–590.
63. Wang, X., Preston, J.F., 3rd, Y Romeo T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol*.186(9):2724–273.

64. Weidenmaier, C., y Peschel, A. (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 6(4).276–287.
65. Williams, M., y Gallo, R. (2015). The Role of the Skin Microbiome in Atopic Dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 15: 65. DOI 10.1007/s11882-015-0567
66. Whitchurch, CB., Tolker-Nielsen, T., Ragas, PC., Y Mattick, JS. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*; 295:1487; <http://dx.doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>.