



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**COMPONENTES AMILOIDES PRESENTES EN BIOPELICULAS  
FORMADAS POR CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis*  
PROCEDENTES DE PERSONAL DE SALUD**

**Autora:**

Kiara Andreina

Tami Camargo

C.I: 20.476.060

**Tutor:** Silvio Barreto

Mérida, Mayo 2019.



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**COMPONENTES AMILOIDES PRESENTES EN BIOPELICULAS**

**FORMADAS POR CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis***

**PROCEDENTES DE PERSONAL DE SALUD**

Trabajo de Grado para Optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

**Autora:**

Kiara Andreina

Tami Camargo

C.I: 20.476.060

**Tutor:** Silvio Barreto

Mérida, Mayo 2019.

## DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, por regalarme la vida y darme la fuerza necesaria para lograr este gran paso, permitiéndome plasmar este gran sueño; cada obstáculo que se me presentó en este largo camino, fueron superados gracias a sus fuerzas, a Él le agradezco lo que soy y permitirme ver hoy reflejado lo que por años luche.

A Mis padres, Florentino Tami y Rocio Camargo De Tami, gracias por regalarme su amor incondicional, y confianza base sin precedente para lograr una meta más en el camino de mi superación, la cual constituye, la herencia más valiosa que pudiera recibir. La vida es difícil, pero la mía es plena y feliz, porque tengo dos brillantes faros que me han guiado por la senda, ¡Qué fácil es todo cuando hay apoyo!, sin ustedes no sería lo que soy, no estaría donde estoy. Muchas Gracias por tanto, los Adoro.

A mi hermana Yeraldini Tami, quien ha sido mi ejemplo de vida, mi motivación y mi fuerza motora, gracias por estar allí en todo momento, por regalarme siempre lo mejor de Tí, por siempre creer en mí, aún en los momentos donde quise desistir de este gran sueño, a ti mi querido Amor Mío, Mil gracias por ese incondicional apoyo, Te Amo.

A mi gran amiga y hermana que me dio este hermoso camino llamado Universidad, a ti Malena Guevara, infinitas gracias por tu amistad incondicional y sincera, por estar siempre para mí cuando más lo necesite, por darme palabras de aliento en todos y cada uno de los momentos que afrontamos los cuales se hicieron más fáciles con tu compañía. Gracias, Te quiero Mucho Hermana.

A mi Novio Jhan Pernia, agradezco a Dios tu compañía, paciencia, apoyo y comprensión, estando siempre para mí. Gracias por llegar a mi vida y regalarme los mejores y más especiales momentos, caminando de mi mano y poder juntos hoy celebrar este sueño, de quien también formaste parte. Gracias Amor, Te Amo!.

A mi familia por su amor incondicional, los cuales constituyeron la motivación principal para poder alcanzar esta meta.

...Hace algunos años era un sueño, hoy se convierte en una realidad.

***Kiara Tami***

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme cumplir este gran paso, sin Él nada hubiese sido posible. A la ilustre y apreciada Universidad de Los Andes, por acogerme durante este largo camino, regalarme los mejores años y momentos, brindándome a través de la calidad de profesionales que la constituyen, los conocimientos necesarios para lograr forjarme como profesional, Gracias por todo.

Al Centro de Microscopia Electrónica Dr. Ernesto Palacios Prù, Mérida-Venezuela, a todos y a cada uno de sus integrantes gracias por acogerme y hacerme sentir parte de ustedes, por todos los conocimientos aportados, así como el abrirme las puertas de sus instalaciones para llevar a cabo el desarrollo de esta investigación. Gracias a todos.

Al Licenciado Silvio Barreto, quien con su profesionalismo y conocimientos brindados, pude llevar a cabo la realización de esta investigación, gracias por su apoyo, paciencia y comprensión en todo momento, quien me hizo entender el valor de la dedicación, grandes sacrificios y constancia, para lograr esta meta que finalmente pude materializar. Gracias por todo, Dios le bendiga.

Al Laboratorio de Microbiología del IPAS-ME, Mérida-Venezuela, en especial a la Licenciada Ana Flores por su colaboración y disponibilidad en el avance de esta investigación, brindando las áreas del laboratorio cuando fue necesario.

Al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos, en Caracas-Venezuela por su receptibilidad y amabilidad, y así lograr con éxito la obtención de las cepas controles utilizadas en esta investigación.

A mi querida y apreciada profesora Judith Velazco, por ser un ejemplo de constancia, y dedicación en el mágico y admirable mundo de la Microbiología. Gracias por su dedicación y ayuda en la culminación de este trabajo. Dios la bendiga siempre, la aprecio mucho.

A la profesoras Elsa Velazco y Beatriz Quintero por su colaboración, conocimientos y el gran apoyo académico brindado en todo este proceso, quienes estuvieron siempre allí, Gracias por todo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b> .....	3
Planteamiento del Problema .....	3
Formulación del Problema .....	3
Objetivos de la Investigación .....	3
Objetivo General .....	3
Objetivos Específicos .....	4
Justificación de la investigación .....	4
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	5
Bases teóricas .....	5
Importancia clínica y epidemiológica de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	6
Formación de biopelícula por <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	8
Formación de componentes amiloides en <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	11
Antecedentes de investigaciones previas .....	15
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO</b> .....	16
Tipo de Investigación .....	16
Diseño de Investigación .....	16
Unidad de Análisis .....	17
Cepas Bacterianas .....	17
Metodología de la Investigación .....	19
Determinación de la formación de biopelículas .....	19

Preparación del inóculo bacteriano .....	19
Formación y visualización de la biopelícula .....	20
Determinación de la producción y cuantificación de los componentes amiloides .....	21
Preparación del inóculo bacteriano .....	21
Formación y cuantificación de los componentes amiloides .....	21
Análisis estadístico .....	23
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
Resultados .....	24
Producción y cantidad de biopelícula producida por las cepas de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> .....	24
Cuantificación de los componentes amiloides en cepas de <i>S. epidermidis</i> formadoras de biopelícula .....	25
Relación entre la formación de biopelícula y la producción de componentes amiloides en las cepas de <i>S. epidermidis</i> .....	26
Discusión .....	27
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>31</b>
Conclusiones .....	31
Recomendaciones .....	32
<b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS .....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>40</b>
Secuencias genómicas de las modulinas fenol solubles $\beta$ -1 y $\beta$ -2 en <i>S.</i> <i>aureus</i> ATCC 6538 .....	40
Metodología para la detección de biopelículas en <i>S. epidermidis</i> .....	41
Formación de biopelícula por cepas de <i>S. epidermidis</i> en microplacas .....	42
Absorbancias obtenidas a partir de barridos espectrales .....	43

Curva de calibración para la cuantificación de componentes amiloides .....	44
Determinación de la producción y cuantificación de los componentes amiloides .....	45

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>Pág.</b>
1 Descripción de las cepas <i>S. epidermidis</i> de acuerdo al origen del aislamiento	.... 18

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
1 Micrografía de una célula de <i>S. aureus</i> que presenta compuestos amiloides en una biopelícula de 5 días de cultivo.....	7
2 Diagrama de las fases de la adhesión y acumulación en el desarrollo de una biopelícula por <i>S. epidermidis</i> .....	9
3 Producción de polisacárido intracelular PIA .....	10
4 Fases de la formación de biopelículas.....	11
5 Estructura de las Modulinas Solubles en Fenol PSM.....	12
6 Secuencia de aminoácidos de las PSM producidas por <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> .....	13
7 Producción de Componentes amiloides en <i>Staphylococcus</i> .....	14
8 Distribución de las cepas de <i>S. epidermidis</i> de acuerdo a la producción de biopelícula.....	24
9 Distribución de las cepas de <i>S. epidermidis</i> formadoras de biopelícula de acuerdo a la cantidad máxima producida.....	25
10 Distribución de las cepas de <i>S. epidermidis</i> de acuerdo a la cantidad máxima producida de componentes amiloides.....	26
11 Distribución de las cepas de <i>S. epidermidis</i> formadoras de biopelícula de acuerdo a la cantidad de componentes amiloides producido.....	27

**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA**  
**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS**  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**COMPONENTES AMILOIDES PRESENTES EN BIOPELÍCULAS**  
**FORMADAS POR CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis***  
**PROCEDENTES DE PERSONAL DE SALUD**

Autora: Kiara Tami

**RESUMEN**

*Staphylococcus epidermidis* es un microorganismo que forma parte de la microbiota normal de piel y mucosas en el hombre. Sin embargo, puede comportarse como un patógeno oportunista causante de infecciones cutáneas superficiales, hasta cuadros clínicos severos, entre los que resaltan la septicemia asociada al uso de dispositivos médicos invasivos (catéteres intravasculares) y material protésico e infecciones de tejidos blandos; debido a la capacidad de adherirse y desarrollar biopelícula en superficies bióticas y abióticas, la cual puede estar favorecida por la expresión de componentes externos a la pared celular del microorganismo como los componentes amiloides. En tal sentido, el objetivo de este estudio fue establecer la relación entre la producción de componentes amiloides con la formación de biopelícula en cepas de *S. epidermidis* aisladas del personal de salud de la Emergencia de Adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA). La producción y cantidad de biopelícula se determinó por el método de microplaca, así como la cuantificación de componentes amiloides. Del total de cepas de *S. epidermidis* evaluadas el 69,2% (18/26) formaron biopelícula, de ellas el 38,9% (7/18) exhibieron un fenotipo hiperproductor. Los aislados de *S. epidermidis* que desarrollaron biopelícula mostraron la capacidad de producir componentes amiloides, aunque no se encontró una relación estadística significativa entre la formación de biopelícula y la producción de componentes amiloides. Estos resultados sugieren que los componentes amiloides y la formación de biopelícula fueron condiciones que favorecieron la colonización del personal médico por cepas de *S. epidermidis*, las cuales expresan características que facilitan su colonización en dispositivos inertes, que contribuyen con su potencial patógeno.

**Palabras clave:** *Staphylococcus epidermidis*, Biopelícula, Componentes Amiloides.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus epidermidis* es un microorganismo que forma parte de la microbiota normal de piel y mucosas en el hombre. Sin embargo, pueden comportarse como bacterias oportunistas causantes desde infecciones cutáneas superficiales hasta cuadros clínicos severos que amenazan la vida del hospedero susceptible. Esta especie bacteriana con frecuencia es causante de septicemias asociadas a dispositivos médicos invasivos (como catéteres intravasculares) e infecciones de tejidos blandos y material protésico (Kristi y col., 2008; Piette y Verschraegen, 2009).

En el ambiente hospitalario circulan cepas de *S. epidermidis* que con frecuencia colonizan al personal que dispensa atención clínica, facilitando de esta manera la diseminación de estos microorganismos entre los pacientes hospitalizados (Aielloa y col., 2003). Asimismo, las infecciones asociadas a dispositivos médicos invasivos como catéteres intravasculares, pueden ser causadas por cepas de *S. epidermidis* que colonizan al paciente. El proceso se inicia luego de ser insertado el catéter al torrente sanguíneo, éste es colonizado por los microorganismos que logran entrar al momento de la punción y facilitan así el establecimiento de un proceso infeccioso (Becker y col., 2014).

La instauración de procesos infecciosos ocasionados por *S. epidermidis* está favorecida por la expresión de componentes externos a la pared celular del microorganismo, permitiendo su adherencia y colonización de superficies bióticas y abióticas (Hira y col., 2012). En este contexto, la literatura señala que las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* producen elementos extracelulares como los componentes amiloides, los cuales facilitan la estructuración de comunidades multicelulares llamadas biopelículas (Schwartz y Boles, 2013; Rapsinski y col., 2015).

Schwartz y Boles, 2013 reportaron que la producción de pequeños péptidos solubles en *S. aureus* median la formación de componentes amiloides en biopelículas, estableciendo de esta manera que la presencia de éstos está relacionada con la formación de un fenotipo de biopelícula sólido.

Las biopelículas son aglomeraciones adherentes de bacterias embebidas dentro de una matriz de exopolisacárido, el conocimiento de los mecanismos de su formación y su papel en procesos infecciosos es de gran importancia, debido a que esta forma de desarrollo bacteriano protege a los microorganismos de la respuesta inmune del hospedero y limita su tratamiento con antimicrobianos (Periasamy y col., 2011).

Adicionalmente, la biopelícula confiere un microambiente ideal para las bacterias que lo conforman, puesto que facilita la transferencia de elementos genéticos móviles portadores de marcadores de resistencia (Madsen y col., 2012). Los cuadros infecciosos asociadas a biopelículas bacterianas se vuelven crónicos; por ello, la aparición de cepas de *S. epidermidis* formadoras de exopolisacárido junto a un fenotipo resistente, podría dificultar aún más el tratamiento de infecciones relacionadas con este tipo de microorganismo, convirtiéndose en un verdadero problema en el ámbito hospitalario.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

Entre las proteínas de superficie que median la formación de biopelícula se encuentran pilis o fimbrias de naturaleza amiloide. En tal sentido, estudios recientes señalan que *S. aureus* sintetiza pequeños péptidos que median la formación de estructuras amiloides para la formación de biopelículas, estableciendo que la presencia de este tipo de compuestos está relacionada con la formación de un fenotipo de biopelícula de estructura compacta (Romero y col., 2010; Schwartz y Boles, 2013). Con base a lo mencionado anteriormente se plantea lo siguiente:

#### Formulación del Problema

¿Cómo influye la presencia de componentes amiloides en la formación de biopelícula de *S. epidermidis* aisladas del personal de salud?

#### Objetivos de la Investigación

##### Objetivo General

Establecer la relación entre la producción de componentes amiloides con la formación de biopelícula en cepas de *S. epidermidis* aisladas del personal de salud de la Emergencia de Adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA).

## **Objetivos Específicos**

- Determinar la producción y la cantidad de biopelícula producida por las cepas de *S. epidermidis* utilizando el método de microplaca.
- Cuantificar los componentes amiloides en las cepas de *S. epidermidis* formadoras de biopelícula en medio PNG suplementado con Rojo Congo.
- Establecer la relación entre la producción de componentes amiloides y la formación de biopelícula en las cepas de *S. epidermidis*.

## **Justificación de la Investigación**

La presente investigación evaluó el papel de los compuestos amiloides en las biopelículas desarrolladas por *S. epidermidis*. Se conoce que este microorganismo es un importante patógeno causante de infecciones en el ámbito hospitalario. Por ello, es importante establecer si la presencia de componentes amiloides está relacionada con la formación de biopelículas, de esta manera se optimizarán las conductas que disminuyan la colonización del personal que brinda asistencia médica, así como los procesos infecciosos asociados a este tipo de microorganismo. Por otra parte, esta información podría brindar nuevos blancos para elaborar sustancias antibacterianas o desinfectantes que permitan controlar el desarrollo de este género bacteriano en ambientes hospitalarios.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Bases teóricas

*S. epidermidis* constituye parte de la microbiota habitual del hombre y son considerados como saprofitos no virulentos. Sin embargo, en los últimos años estas bacterias han emergido como una de las principales causas de infecciones en el ámbito clínico (Møretrø y col., 2003).

Al inicio de la década de los años 80 la importancia clínica de estos microorganismos aumentó debido a que causan con frecuencia septicemia en pacientes hospitalizados por largos períodos. En este tipo de infección, se asume que la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* son de origen endógeno y su ingreso vía hematógena está asociada a la utilización de procedimientos invasivos causando un enorme impacto en la salud pública (Makki y col., 2011).

Se estima que *S. epidermidis* es el responsable del 36% de las infecciones nosocomiales en pacientes sépticos, con una tasa de mortalidad del 13,6% aproximadamente. Asimismo, algunos estudios han demostrado que la elevada incidencia de sepsis no sólo se debe al uso de dispositivos médicos invasivos, sino también a la capacidad de estas bacterias de colonizar y desarrollar biopelícula rápidamente sobre la superficie del biomaterial y el tejido circundante a éste. Por ello, la producción de este exopolisacárido es considerado el principal factor de virulencia de esta especie bacteriana (Hira y col., 2010; Nunes y col., 2012).

La biopelícula es un campo de protección para las bacterias que la conforman, debido a que evita la fagocitosis de los macrófagos y de los neutrófilos del sistema inmune del hospedero. Las bacterias al adherirse a la superficie de un dispositivo

médico invasivo o tejido vivo, liberan antígenos que activan a los fagocitos, sin embargo, la matriz de exopolisacárido las protege de su acción (Schommer y col., 2011). Las infecciones causadas por *S. epidermidis* formadoras de biopelículas difícilmente son superadas por los mecanismos de defensa del hospedero, por lo que, muchas veces se convierten en infecciones crónicas aun en individuos con una excelente respuesta humoral y celular (Macintosh y col., 2009).

Las biopelículas son aglomeraciones de microorganismos embebidas dentro de una matriz de exopolisacárido, su formación ocurre cuando las bacterias planctónicas median su adherencia a la superficie y a otras células bacterianas a través de unas estructuras filamentosas de naturaleza amiloideas, las cuales permiten una enérgica fijación de las bacterias dentro de la matriz extracelular (Van Gerven y col., 2015).

Se ha descrito que las fibras amiloides (conocidas como curli) en microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* evaden la respuesta inmune del hospedero, colonizan su tejido y posteriormente forman biopelícula. En relación al género *Staphylococcus*, otros estudios señalan que la especie *S. epidermidis* produce compuestos amiloides similares a los observados en los gérmenes descritos anteriormente, facilitando su adhesión a superficies bióticas y abióticas, así como también favorece la estructura de la biopelícula formada (Schwartz y Boles, 2013; Romero y Kolter, 2014).

### **Importancia clínica y epidemiológica de *Staphylococcus epidermidis***

*S. epidermidis* son cocos grampositivos, no móviles, catalasa positivo y anaerobios facultativos, se disponen como células simples, en pares, tétradas y en cadenas cortas, aunque frecuentemente forman grupos semejantes a racimos (Koneman y col., 2013). Estos microorganismos conforman la microbiota habitual del hombre y son considerados como saprofitos. Sin embargo, en los últimos años estas bacterias han emergido como una de las principales causas de infecciones en el ámbito hospitalario (Møretrø y col., 2003).

La importancia clínica de *S. epidermidis* como patógeno oportunista se debe a que estos microorganismos causan con frecuencia septicemia en pacientes hospitalizados por largos períodos. En este tipo de infección, la mayoría de los microorganismos son de origen endógeno y su ingreso vía hematógena está asociada a la utilización de dispositivos médicos invasivos (Makki y col., 2011).

Asimismo, algunos estudios reportan que las infecciones causadas por *S. epidermidis* en el ambiente hospitalario corresponden al personal clínico colonizado por cepas mutirresistentes, debido a que facilitan la transmisión cruzada de las bacterias hacia el paciente susceptible, convirtiéndose en la causa principal de septicemias relacionadas con el uso de catéteres intravasculares (Lis y col., 2009 ; Piette y Verschraegen, 2009).

Como patógeno hospitalario, la mayor incidencia de infecciones causadas por *S. epidermidis* se observa en piel y tejido blando, sin embargo puede afectar otras áreas del cuerpo como el sistema circulatorio. Uno de los factores de riesgo que sirve como puerta de entrada de *S. epidermidis* en el hospedero, es la utilización de dispositivos médicos invasivos como los catéteres intravasculares, los cuales pueden ser colonizados por este microorganismo y posteriormente desarrollar biopelículas. Por lo tanto, la biopelícula es un nicho de protección para los microorganismos que lo conforman, debido a que imposibilita su eliminación por los componentes del sistema inmune del hospedero (Figura 1) (Vandecasteele y col., 2002; Weisser y col., 2010).

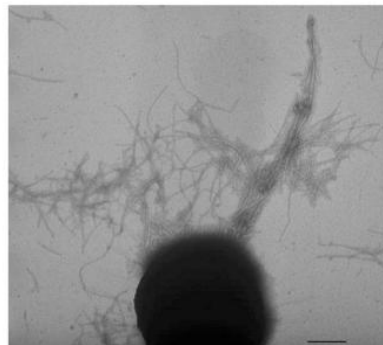


Figura 1. **Micrografía de una célula de *S. aureus* que presenta compuestos amiloides en una biopelícula de 5 días de cultivo** (Schwartz y Boles, 2013).

## Formación de biopelícula por *Staphylococcus epidermidis*

Una biopelícula es un depósito no estructurado de células y de glucocálix acumulado, compuesto por exopolisacárido y una compleja comunidad de bacterias, donde se observa un ensamblado de microorganismos dentro de una matriz con la capacidad de adherirse a biomateriales o tejidos dañados del hospedero, favoreciendo de esta manera su colonización (Figura 2)(Donlan, 2002).

Las biopelículas formadas por cepas de *S. epidermidis* con frecuencia se relacionan con la colonización de dispositivos médicos invasivos (catéteres intravasculares, válvulas cardíacas y prótesis, entre otras) y con una variedad de infecciones crónicas (Becker y col., 2014). A continuación se describe el proceso que da lugar a la formación de la biopelícula por *S. epidermidis*:

- **Adhesión inicial:** La proteína asociada a la acumulación Aap promueve la adhesión inicial de los estafilococos directamente a la superficie del biomaterial (zona color negro) a través de la región o dominio A (color rojo) (Figura 2). Asimismo, la matriz extracelular del hospedero (fibrinógeno, fibronectina, colágeno, vitronectina o laminina) cubre rápidamente al biomaterial (zona rojo ladrillo). Para facilitar también la adhesión inicial de los microorganismos por medio de proteínas de superficie ubicadas en la pared celular de la bacteria denominadas MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (Figura 2). Posteriormente, la región A de la proteína Aap a través de un proceso de proteólisis es removida y el dominio B promueve la agregación bacteriana (Figura 2) (Cue y col., 2012; Cui, y col., 2013; Speziale y col., 2014).
- **Acumulación o agregación bacteriana:** En esta fase los estafilococos inician la agregación bacteriana que consiste en la fijación de los microorganismos a la superficie biótica o abiótica mediante la unión célula-célula, donde participan activamente las proteínas de superficie MSCRAMM. Por otra parte, de forma

simultánea se inicia la producción del polisacárido de adhesión intercelular PIA (polysaccharide intercelular adhesión) y así conformar una biopelícula madura. La expresión del PIA en *S. epidermidis* es un factor importante en la acumulación de la biopelícula, sin embargo, se han descrito cepas de origen clínico que no producen polisacárido PIA, debido a que expresan solamente la proteína Aap, sustituyendo funcionalmente al PIA (Figura 2)(Ogara, 2007; Rhode y col., 2010; Speziale y col., 2014).

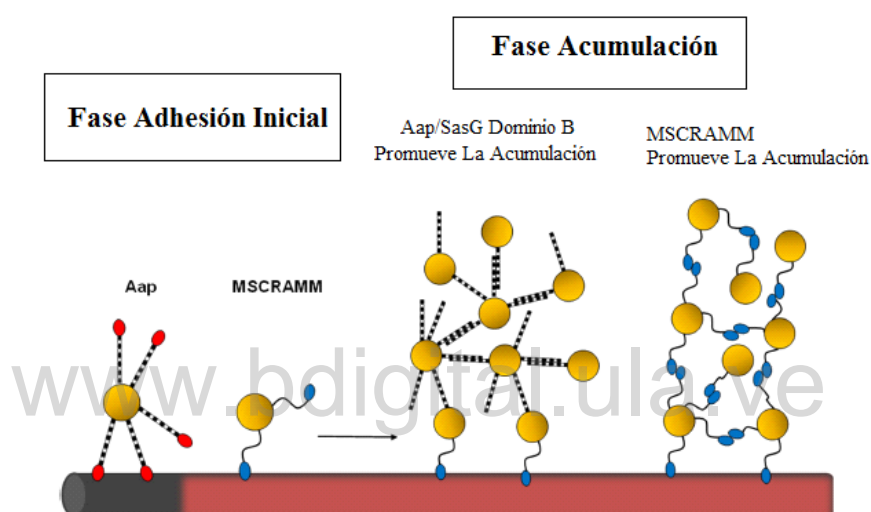


Figura 2. Diagrama esquemático de las fases de la adhesión y acumulación en el desarrollo de una biopelícula por *S. epidermidis* (Speziale y col., 2014).

El polisacárido PIA es sintetizado por cuatro proteínas (IcaA, IcaD, IcaB e IcaC), codificadas por el operón *icaADBC*. Las moléculas transmembranales IcaA e IcaD sintetizan a partir del UDP-N-acetilglucosamina un oligómero N-acetilglucosamina de 20 residuos de longitud. Luego una proteína de membrana (IcaC) procesa y transforma el oligómero IcaAD recién formado en otro de 130 residuos. Posteriormente, la molécula IcaB deacetila al PIA produciendo un polímero aniónico, favoreciendo la interacción del polisacárido intercelular con superficies de naturaleza catiónica (Figura 3) (Rhode y col, 2010; Cue y col., 2012; Longauerova y col., 2006).

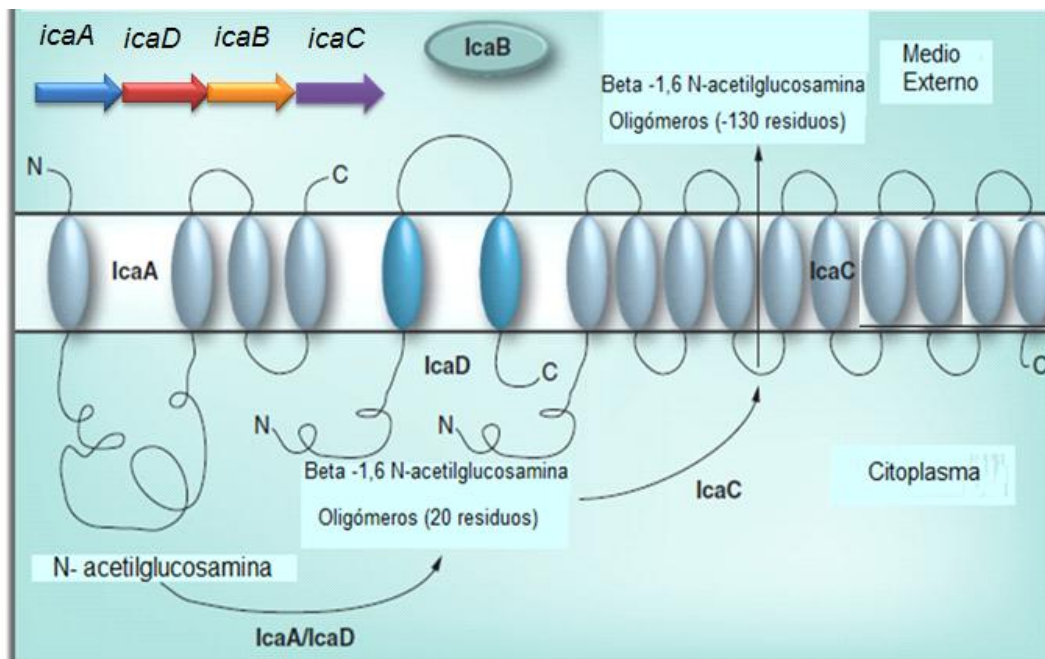


Figura 3. Esquema que muestra la producción del polisacárido intracelular PIA (Lavery y col., 2013).

La síntesis del PIA en estafilococos es regulado principalmente a nivel transcripcional, es decir a través de la activación o represión de genes específicos que codifican la producción de pequeñas moléculas que regulan la producción del PIA y funciones fisiológicas (virulencia), en respuesta a condiciones ambientales como: variaciones de temperaturas y osmolaridad, anaerobiosis y la exposición de los microorganismos a concentraciones sub-inhedoras de antibióticos PIA (De Silva y col., 2002; Cerca y col., 2005).

- Desprendimiento de la biopelícula: Luego de la maduración del exopolisacárido, los microorganismos comienzan a desprenderse del biomaterial y se diseminan a través del torrente sanguíneo pudiendo colonizar otros órganos por bacterias planctónicas.

La disociación de la biopelícula es considerado como un mecanismo de diseminación bacteriana en el hospedero infectado, iniciado probablemente por

variaciones en el pH, agotamiento de los nutrientes y la acumulación de residuos dentro de la biopelícula, así como a través de la actividad enzimática extracelular de las modulinas solubles en fenol PSM (Phenol Soluble Modulins), las cuales, funcionan como agentes surfactantes destruyendo las interacciones célula-célula dentro del exopolisacárido (Figura 4) (Ogara, 2007; Becker y col., 2014).

Sin embargo, a través de un proceso de polimerización las PSM forman compuestos o estructuras amiloides que participan activamente en el desarrollo y la estabilización de la biopelícula formada por *S. epidermidis*. Los compuestos amiloides se encuentran en la superficie de la biopelícula bacteriana formando además canales dentro del exopolisacárido que permiten el acceso de los nutrientes hacia su interior (Figura 4) (Cheung y col., 2014; Hobley y col., 2015).

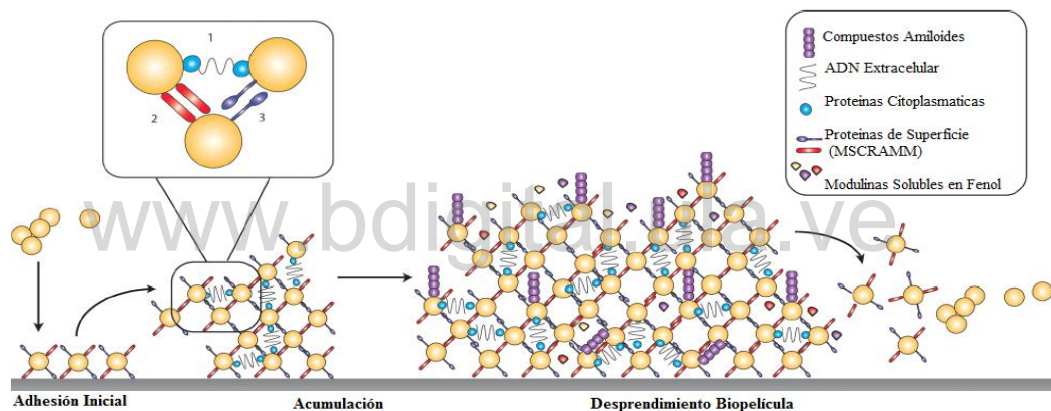


Figura 4. Ilustración que muestra las fases de la formación de biopelícula (Hobley y col., 2015).

### Formación de componentes amiloides en *Staphylococcus epidermidis*

Los componentes amiloides son estructuras externas a la pared celular de los estafilococos, constituidos por la polimerización de pequeños péptidos denominados modulinas solubles en fenol (PSM). Las PSM son monómeros anfipáticos (hidrófobos e hidrófilos) que presentan una estructura  $\alpha$  hélice, una metionina N-formilada en su extremo N-terminal y además propiedades surfactantes (Figura 5) (Periasamy y col., 2011; Taglialegna y col., 2016).

Las PSM en *S. epidermidis* y *S. aureus* se clasifican de acuerdo a su longitud como PSM- $\alpha$  (20-25 aminoácidos), PSM- $\beta$  (43-45 aminoácidos). Ambas especies bacterianas expresan cuatro PSM- $\alpha$  y dos PSM- $\beta$  codificadas por el loci *psm*  $\alpha$  y *psm*  $\beta$ , respectivamente. Por otra parte, en estos microorganismos se ha reportado la producción de la toxina PSM- $\delta$  (25-26 aminoácidos) expresada por el gen *hld*, el cual se encuentra ubicado dentro del locus RNAIII (molécula efectora del sistema regulador accesorio Agr o Quórum Sensing) (Figura 6) (Cheung y col., 2014; Taglialegna y col., 2016).

De igual forma, las PSM son sintetizadas a nivel del citoplasma bacteriano y su expresión es regulada a través de la unión de la molécula AgrA (*agrA*) al loci *psm* en lugar de la molécula efectora RNAIII. Posteriormente, los pequeños péptidos son secretados a través de un complejo sistema transportador (casette ABC) dependiente de ATP, conformado por dos componentes de membrana (PmtB y PmtD) y dos ATPasas (PmtA y PmtC). Una vez en el medio extracelular, las PSM pueden estar presentes como péptidos solubles o polimerizados como componentes amiloides (Figura 7) (Taglialegna y col., 2016).

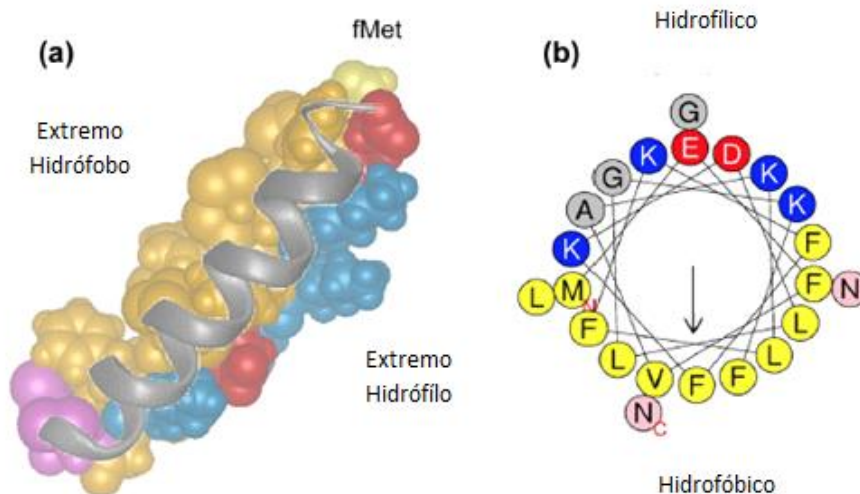


Figura 5. Estructura de las PSM (Cheung y col., 2014).

Parte (a) representación  $\alpha$ -hélice de la PSM. Parte (b) los aminoácidos de naturaleza hidrofóbica están en color amarillo, mientras que los aminoácidos hidrófilos se representan en azul (carga positiva) o rojo (carga negativa) (Cheung y col., 2014).

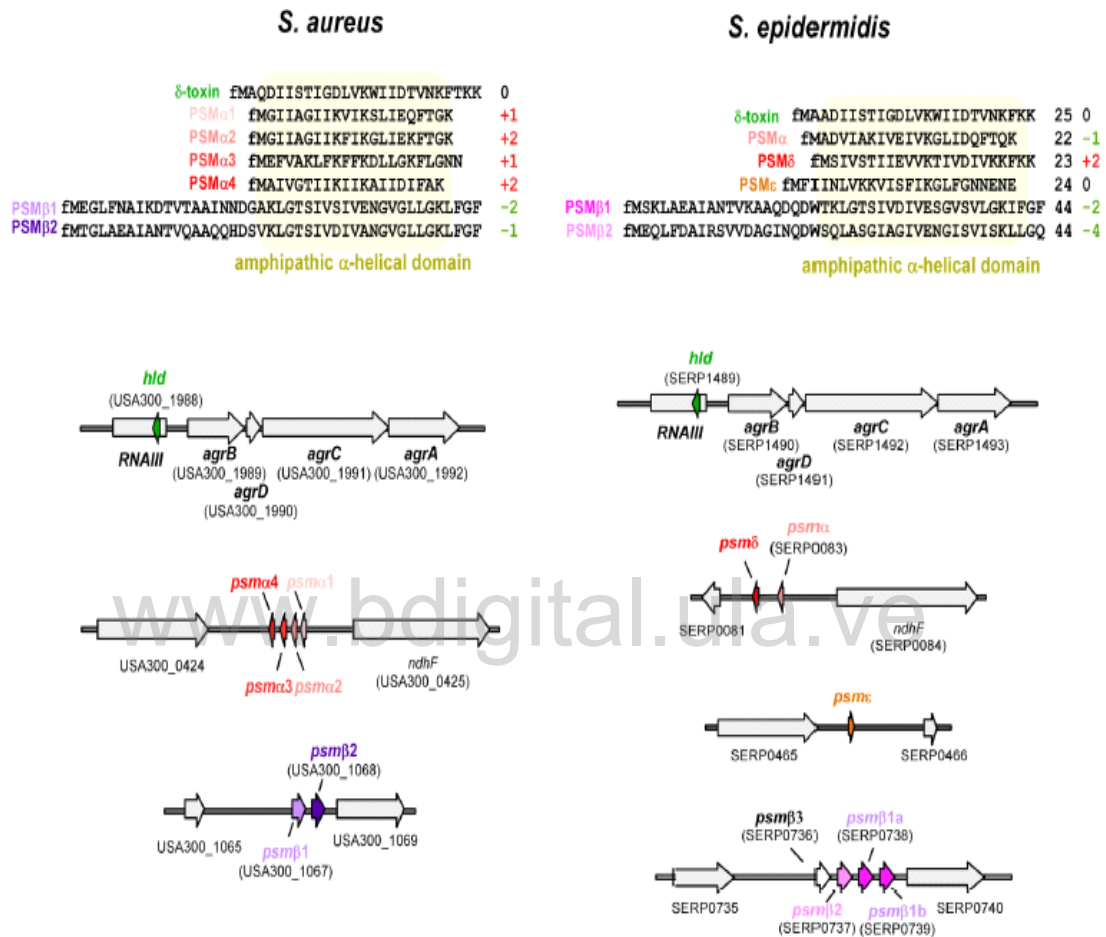


Figura 6. Secuencia de aminoácidos de las PSM producidas por *S. aureus* y *S. epidermidis* (parte superior), tomado de (Cheung y col., 2014).

Los números representados en la parte derecha demuestran la carga neta de los péptidos a un pH de 7,0 redondeado a números enteros y considerando la N-formilación. Representación esquemática del loci *psm* de las cepas *S. aureus* USA300 FPR3757 y *S. epidermidis* RP62A, respectivamente (parte inferior) (Cheung y col., 2014).

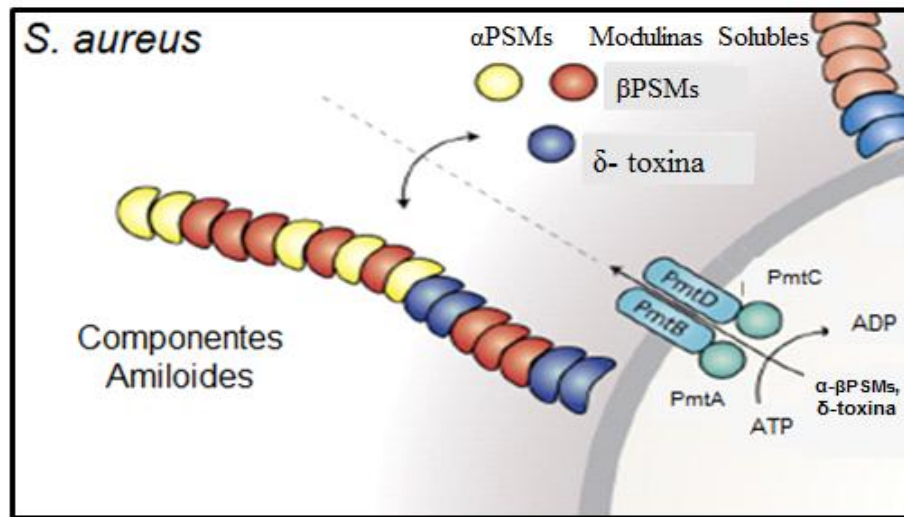


Figura 7. **Producción de componentes amiloides en *Staphylococcus*** (Taglialegna y col., 2016).

Las PSM tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ , y las  $\delta$ -toxinas se transportan fuera de la célula bacteriana a través del sistema transportador ABC dependiente de ATP (proteínas transmembranales PmtB y PmtD a las ATPasas PmtA y PmtC). Las PSM, pueden estar presentes como monómeros solubles o en forma de componentes amiloides. La expresión de los genes que codifican las modulinas tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ , y las  $\delta$ -toxinas son inducidas por la molécula AgrA, siendo este el regulador responsable del sistema regulador accesorio Agr (Taglialegna y col., 2016).

Cuando los péptidos son solubles en el medio extracelular, forman una  $\alpha$  hélice anfipática con propiedades surfactantes que promueven el desensamblaje de una biopelícula formada, estimulan la quimiotaxis de neutrófilos y favorecen la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Por el contrario, bajo condiciones ambientales desconocidas las PSM  $\alpha$  hélice solubles cambian a agregados proteicos ricos en cadenas  $\beta$  (polimerización) dando origen a los componentes amiloides; en este estado, las estructuras amiloides pueden mediar la adhesión celular a superficies bióticas e inertes y participan en la unión célula-célula, dando origen a la conformación de una biopelícula firme a través de canales que proveen soporte. De este modo, las PSM son proteínas bifuncionales, las cuales pueden almacenarse como fibrillas inertes en una

biopelícula bacteriana hasta que se originan las condiciones que promuevan su disociación y posterior desensamblaje del exopolisacárido (Romero y col., 2010; Schwartz y col., 2012; Syed y Boles, 2014).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se debe señalar que la producción de componentes amiloides en *S. epidermidis* podrían participar en la colonización del personal clínico y a partir de ahí generar procesos infecciosos asociados a la atención sanitaria debido a la formación de biopelícula. Por ello, no sólo es importante identificar las cepas que expresen estos fenotipos, sino también determinar las correctas medidas de control que impidan la colonización de los mismos durante la atención del paciente.

### **Antecedentes de investigaciones previas**

De acuerdo a la bibliografía consultada en las diferentes bases de datos de Biomedicina, son escasas las investigaciones sobre componentes amiloides y su asociación con el desarrollo de biopelícula en el género *Staphylococcus*. La mayoría de los reportes sobre estas estructuras se han centrado en microorganismos como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Romero y col., 2010).

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### **Tipo de Investigación**

Hurtado (2010), refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber. Pues, esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso e identifica el tipo de investigación. En este sentido se desea evaluar la producción de componentes amiloides en cepas formadoras de biopelícula de *S. epidermidis* aisladas del personal de salud la Emergencia de Adultos del IAHULA, Mérida-Venezuela.

Por lo tanto haciendo referencia a lo anterior, esta investigación pretende realizar un tipo de estudio descriptivo, definiéndose así por Hurtado como “La descripción o caracterización de un evento de estudio dentro de un contexto particular, identificando las características del evento estudiado”. Así mismo esta investigación realizara un análisis comparativo; precisando las diferencias y semejanzas que existen entre dos o más grupos con respecto a un mismo evento.

#### **Diseño de Investigación**

La investigación realizada es de carácter experimental; este tipo de investigación según Sabino (1992), es aquel experimento en el cual el objeto de estudio se somete a la influencia de ciertas variables, en condiciones controladas y conocidas por el investigador, en efecto el análisis precedente será de tipo prospectivo, en este tipo de estudio toda la información se recolecta de acuerdo con los criterios del investigador, para fines específicos de la investigación y después de planeada la misma; y por otra

parte es de tipo transversal, el cual consiste en la toma de datos en un momento único, mediante los criterios de uno o más grupos de unidades, sin pretender evaluar la evolución de esas unidades donde el propósito será describir variables y analizar su incidencia e interrelación en un momento determinado.

### **Unidad de Análisis**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ultraestructural, Centro de Microscopía Electrónica Dr. Ernesto Palacios Prú, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela y en el Laboratorio de Microbiología del IPAS-ME, Mérida-Venezuela.

### **Cepas Bacterianas**

Para esta investigación, se analizaron un total de 26 cepas de *S. epidermidis*, los microorganismos descritos fueron recuperados en un sólo evento de recolección (Febrero del año 2013), aisladas a partir de manos, fosa nasal y teléfonos celulares del personal médico y de enfermería de la Emergencia de Adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida- Venezuela (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las cepas de *S. epidermidis* de acuerdo al origen del aislamiento

<i>S. epidermidis</i> (Código)	Procedencia	Número
1M, 2M, 3M, 5M, 8M, 12M, 28M1, 28M2, 31M, 32M, 34M, 36MB.	Manos	12
2FN, 3FN, 6FN, 7FN, 8FN, 10FN, 12FN, 30FN, 33FN, 41FN1, 61FN.	Fosas Nasales	11
7CEL, 8CEL, 32CEL.	Teléfono Celular	03
	Total	26
Cepas de Referencia (Código)		
<i>S. aureus</i> CVCM 721	CVCM	01
<i>S. epidermidis</i> CVCM 2175	CVCM	01

Fuente: *Propia*

CVCM: Centro Venezolano de Colección de Microorganismos.

M: manos; FN: fosa Nasal; CEL: Teléfono Celular.

Para los ensayos de este trabajo se utilizaron cepas controles del Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM): *S. aureus* CVCM 721 y *S. epidermidis* CVCM 2175.

La cepa *S. aureus* CVCM 721 es un microorganismo derivado de *S. aureus* ATCC 6538 formador de biopelícula acorde a lo reportado por Vázquez y col., (2013) y productora de componentes amiloides de acuerdo a las secuencias genómicas de las modulinas solubles en fenol reportadas en el NCBI (National Center for

Biotechnology Information) (Anexo 1). Mientras la cepa *S. epidermidis* CVCM 2175 es procedente de *S. epidermidis* ATCC 12228 no formador de biopelícula y productora de componentes amiloides según el trabajo de Gill y col., (2005).

Para reactivar y lograr la estabilidad metabólica de las cepas se procedió a cultivarlas en un 1 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI®), colocándolas en baño de María con agitación durante 24 horas. Luego se cultivó cada cepa en agar Sangre al 5% (AS Oxoid®) por agotamiento y se incubó en microaerofilia por 24-72 horas. Todas las temperaturas de los cultivos fueron a 37 °C.

## **Metodología de la investigación**

### **Determinación de la formación de biopelículas**

#### **Preparación del inóculo bacteriano**

Para la preparación de los inóculos bacterianos se transfirió con un asa bacteriológica de 3 a 4 colonias de cada cepa a un tubo con 3 mL de caldo TS y se comparó con el patrón 0,5 de McFarland. Posteriormente, con la finalidad de estandarizar la misma concentración celular en todos los inóculos bacterianos, se determinaron las densidades ópticas (DO) alcanzadas por cada una de las cepas. Para ello, se colocaron 100µL de cada uno de los inóculos en un pozo de una microplaca (BD, Falcon de 96 pozos) y se llevó a un espectrofotómetro (Termo) para su lectura a una longitud de onda de 620 nm. Las DO alcanzadas en las 26 cepas estuvieron entre 0,37 a 1,70. A partir de estos resultados, se estableció que se utilizaría el inóculo con DO de 0,37 para el estudio de la formación de biopelículas. Todas las cepas fueron ajustadas a este inóculo en caldo TS.

## Formación y visualización de la biopelícula

Los inóculos bacterianos obtenidos en el procedimiento anterior se utilizaron para el estudio de la formación de biopelícula, siguiendo el procedimiento descrito por (O'toole 1999; Barreto y col., 2009). Se agregaron 150µL del inóculo en cada pozo de una placa de poliestireno y luego, se incubaron a 37 °C por un período de 24 horas. Posteriormente, se corroboró el crecimiento bacteriano en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.

Para visualizar la formación de la biopelícula se removieron las células planctónicas, descartando el medio de cultivo por inmersión de la placa de poliestireno en una bandeja con agua destilada. El exceso de agua se eliminó sacudiendo suavemente la placa y dejándola secar en forma invertida sobre un papel absorbente a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, las células sésiles (adheridas a las paredes del pozo) fueron teñidas con 200µL del colorante cristal-violeta al 1 % por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el exceso de colorante se eliminó lavando los pozos 3 veces por inmersión en agua destilada. La formación firme de un substrato o botón adherido al fondo del pozo se considera como una prueba positiva para la producción de biopelícula (Anexo 2 y 3).

Asimismo, en esta investigación se estableció que una cepa es positiva para la formación de biopelícula cuando su DO presentase una lectura cuatro veces mayor que el valor del pozo control o sin bacteria (blanco), reportado por Soto y col., (2006), es decir, que el punto de corte es el resultado de la DO del pozo control multiplicado por cuatro, como se muestra en la fórmula siguiente:

$$\text{Punto de corte formación de biopelícula} = \text{DO del pozo control o blanco} \times 4$$

Para la producción de biopelícula se realizaron tres experimentos independientes, en cada uno de ellos se obtuvieron tres lecturas de los pozos control y con inóculos bacterianos, los cuales se promediaron. Asimismo, se establece que la cantidad de biopelícula formada es la proporción en DO por encima del punto de corte:

$$\text{Cantidad de biopelícula formada } \times \text{ N}^{\circ} \text{ de veces} = \frac{\text{DO en el pozo evaluado}}{\text{Punto de corte}}$$

Por consiguiente, se estableció que, de los tres experimentos independientes, por lo menos dos debían estar por arriba del punto de corte y así considerar a la cepa como formadora de biopelícula. También se consideró que los aislados que produjeron cantidades de biopelícula 3 veces por encima del punto de corte se clasificaron como hiperproductoras, y las cepas que se ubicaron por debajo de ese valor de les denominó hipopproductoras.

## **Determinación de la producción y cuantificación de los componentes amiloides**

### **Preparación del inóculo bacteriano**

Se prepararon inóculos bacterianos transfiriendo con un asa bacteriológica de 3 a 4 colonias de cada cepa a un tubo de ensayo con 3 mL de caldo PNG (Peptona 3,3 g/L - NaCl 2,6 g/L - Glucosa 3,3 g/L), luego se comparó con el patrón de turbidez 0,5 de McFarland y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las condiciones de cultivo descritas favorece la producción de componentes amiloides en *Staphylococcus* (Schwartz y col., 2012).

### **Formación y cuantificación de los componentes amiloides**

Previo a la cuantificación de los componentes amiloides, se procedió a establecer la longitud de onda óptima a través de un barrido espectral (300-700 nm) en un espectrofotómetro (Shimadzu Uv-mini 1240), a partir de soluciones patrones del colorante Rojo Congo en concentraciones crecientes (2,5µg/mL – 25µg/mL) (Anexo 4). Luego, se estableció una longitud de onda de 496 nm y la solución patrón de 10µg/mL como las condiciones de trabajo respectivamente. Asimismo, con el empleo

del espectrofotómetro se construyó una curva de calibración usando soluciones patrones del colorante rojo congo (entre 2,5µg/mL y 25µg/mL). La curva de calibración permitió representar gráficamente la señal (Absorbancia) que se mide del analito en función de la concentración del colorante (Anexo 5).

La cuantificación de los componentes amiloides se realizó siguiendo los procedimientos descritos por (Kimizuka y col., 2009) y (Ambalam y col., 2012), con modificaciones. Se transfirieron 1,5mL de cada cultivo bacteriano a tubos de microcentrifuga estériles y se centrifugaron a 9000 rpm por 10 minutos. Luego se descartó el sobrenadante con cuidado para no desechar el paquete celular. Luego los paquetes celulares se resuspendieron con 500µL de PBS (buffer fosfato salino pH 7,4) y se procedió a agregar 40µL de Rojo Congo (10µg/mL); después se incubaron a 37°C por un tiempo de 15 minutos. Posteriormente, se procedió a centrifugar nuevamente los tubos a 12000 rpm por 1 minuto, obteniéndose un paquete celular de color rojo y el sobrenadante (Anexo 6). En esta etapa, las cadenas β amiloides de las fibrillas presentes en el sobrenadante se encuentran unidas al Rojo Congo, característica utilizada para la detección de compuestos o estructuras amiloides *in vitro* o *in vivo* (Romero y col., 2010).

La cantidad de componentes amiloides unida al colorante (sobrenadante) se midió en el espectrofotómetro utilizando la curva de calibración del Rojo Congo. Para ello, se realizaron tres experimentos independientes, en cada uno se obtuvieron tres lecturas de las cepas control y los aislados bacterianos, las cuales se promediaron. A partir de estos datos, la cuantificación de las fibrillas amiloides producidas por cada cepa bacteriana se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{Concentración componentes amiloides}] = [\text{concentración RC}_S] - [\text{concentración RC}_{\text{SPT}}]$$

Donde RC<sub>S</sub>: rojo congo unido a las fibrillas amiloides en el sobrenadante.

RC<sub>SPT</sub>: solución patrón de trabajo rojo congo (10 µg/mL).

## **Análisis estadístico**

El origen de las cepas *S. epidermidis* fueron comparados con la formación de biopelículas mediante las pruebas de Chi cuadrado y el test exacto de Fisher, estableciendo que valores de  $p < 0,05$  indicaron significancia estadística. La producción de componentes amiloides y la formación de biopelícula se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson y de Spearman determinando que valores de  $p < 0,05$  indicaron significancia estadística.

Las pruebas antes mencionadas se realizaron utilizando los paquetes Statistical Product and Service Solutions (SPSS) versión 21 para macOS El Capitán.

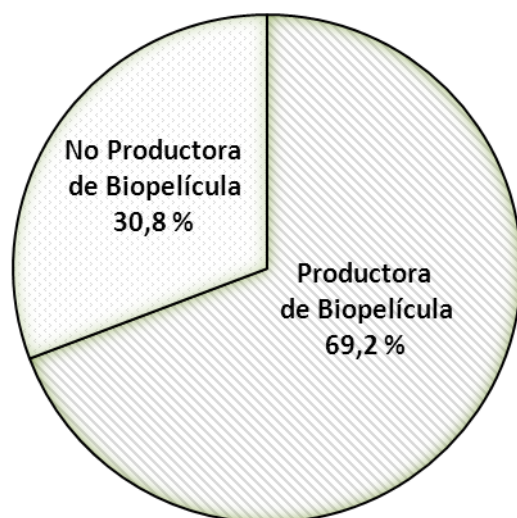
[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO IV

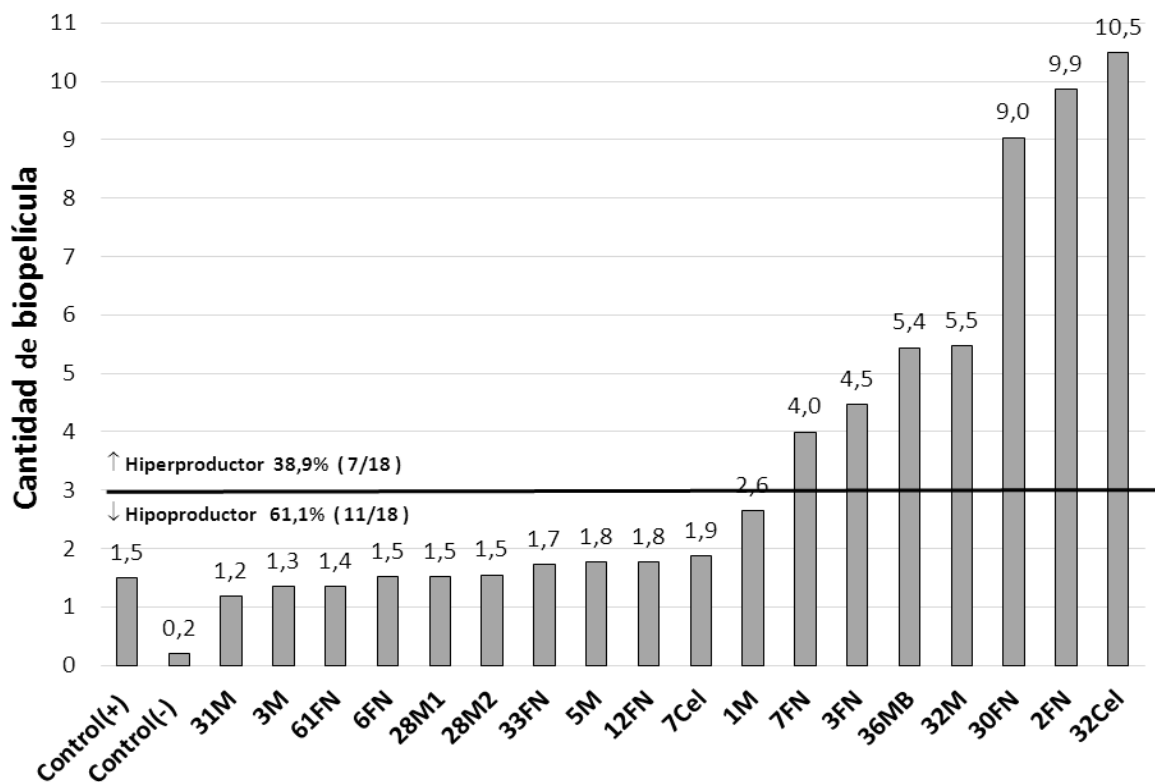
### RESULTADOS

#### **Producción y cantidad de biopelícula producida por las cepas de *S. epidermidis***

La formación de biopelícula se observó en el 69,2% (18/26) de las cepas de *S. epidermidis*. (Figura 8). Todos los aislados identificados como productores de biopelícula mostraron cantidades máximas de matriz extracelular entre 1,2 y 10,5 veces sobre el punto de corte (DO del blanco x 4) (Figura 9). En este grupo las cepas 30FN, 2FN y 32Cel exhibieron proporciones de expolisacárido muy elevadas (entre 9 y 10,5 veces por encima del punto de corte). Asimismo, el 38,9% (7/18) de las cepas de *S. epidermidis* fueron hiperproductoras de biopelícula (3 proporciones > sobre el punto de corte). (Figura 9).



**Figura 8. Distribución de las cepas de *S. epidermidis* de acuerdo a la producción de biopelícula.**



www.bdigital.ula.ve  
M, manos; FN, fosa nasal; Cel, teléfono celular

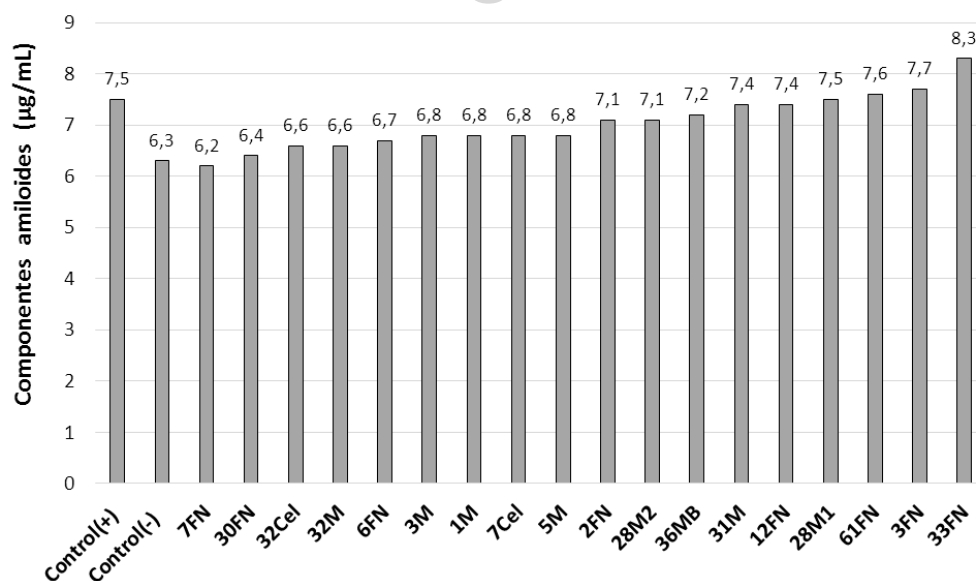
**Figura 9. Distribución de las cepas de *S. epidermidis* formadoras de biopelícula de acuerdo a la cantidad máxima producida.**

**Cuantificación de los componentes amiloides en cepas de *S. epidermidis* formadoras de biopelícula**

Al analizar las cantidades de componentes amiloides en todos los aislados, se determinó que las concentraciones de las mismas estuvieron entre 6,2 y 8,3 µg/mL. Sólo las cepas 28M1 (7,5µg/mL), 61FN (7,6µg/mL), 3FN (7,7 µg/mL) y 33FN (8,3µg/mL) mostraron una concentración de estas estructuras mayor o igual a la observada en el control positivo (7,5µg/mL) (cepa formadora de biopelícula y productora de componentes amiloides) (Figura 10).

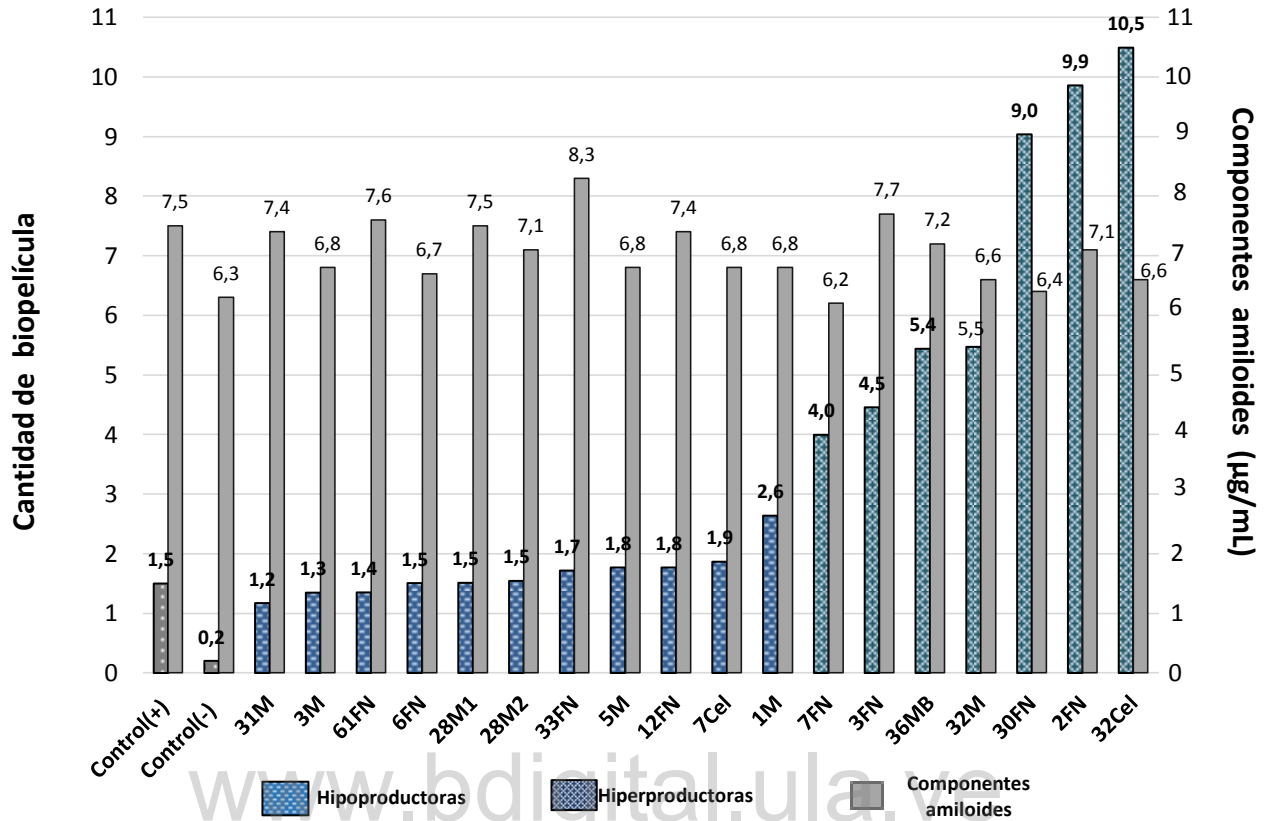
### Relación entre la formación de biopelícula y la producción de componentes amiloides en las cepas de *S. epidermidis*

En las cepas de *S. epidermidis* analizadas se pudo observar que la cantidad de biopelícula desarrollada con respecto a la concentración de componentes amiloides en cada uno de los microorganismos bacterianos fue variable, entre los cuales se pueden mencionar: cepa 31M (biopelícula 1,2 versus, componentes amiloide 7,4  $\mu\text{g/mL}$ ); cepa 33FN (biopelícula 1,7 versus, componente amiloide 8,3  $\mu\text{g/mL}$ ); cepa 1M (biopelícula 2,6 versus, componente amiloide 6,8  $\mu\text{g/mL}$ ); cepa 32M (biopelícula 5,5 versus, componente amiloide 6,6  $\mu\text{g/mL}$ ); cepa 30FN (biopelícula 9,0 versus, componente amiloide 6,4  $\mu\text{g/mL}$ ); y la cepa 32Cel (biopelícula 10,5 versus, componente amiloide 6,6  $\mu\text{g/mL}$ ) respectivamente. Asimismo, se encontró que las concentraciones de componentes amiloides mostraron variaciones mínimas en las cepas hipoproducidas e hiperproductoras de biopelícula, es decir las diferencias más evidentes resultaron en relación a la cantidad de matriz extracelular producida. No se encontró una relación estadística entre la formación de biopelícula y la producción de componentes amiloides ( $p > 0,05$ ) (Figura 11).



M, manos; FN, fosa nasal; Cel, teléfono celular

**Figura 10. Distribución de las cepas de *S. epidermidis* de acuerdo a la cantidad máxima producida de componentes amiloides.**



M, manos; FN, fosa nasal; Cel, teléfono celular

**Figura 11. Distribución de las cepas de *S. epidermidis* formadoras de biopelícula de acuerdo a la cantidad de componentes amiloides producido.**

## DISCUSIÓN

*S. epidermidis* se conoce como una especie bacteriana que forma parte de la microbiota del hombre, sin embargo, en los últimos años se ha reportado como agente causal de infecciones asociadas a la atención sanitaria (Danuta y col., 2009). En el ambiente hospitalario, el personal que presta asistencia médica pueden ser portadores de este microorganismo por prolongados periodos y así servir como un foco de diseminación entre los pacientes recluidos en el centro de salud (Rashid y col., 2012).

Al respecto, se conoce que las manos de los médicos y enfermeras son la principal vía de transmisión de patógenos en el ámbito hospitalario (Tajeddin y col., 2016).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que los teléfonos móviles proporcionan excelentes condiciones de temperatura y humedad en su superficie que facilitan el desarrollo de *Staphylococcus* (Ulger y col., 2015; Ustun y Cihangiroglu, 2015), bajo estas circunstancias el uso de teléfonos celulares en el ambiente hospitalario seguramente favorecen la transferencia de *S. epidermidis* desde las manos y las fosas nasales del trabajador hospitalario, hacia el aparato y viceversa, elevando de esta manera el riesgo de transmisión cíclica o cruzada entre personal de salud-celular-pacientes.

Las cepas de *S. epidermidis* con frecuencia están asociadas a infecciones intrahospitalarias, debido a su capacidad de adherirse y formar biopelícula en dispositivos médicos invasivos (catéteres, prótesis, entre otros), así como en tejido desvitalizado o lesionado por cirugías o traumatismos (Oliveira y Cunha, 2010), este mecanismo de patogenicidad aunado a la procedencia de los aislados de esta especie bacteriana en el presente estudio, resaltan la importancia de los resultados obtenidos. En tal sentido, el 69,2% de las cepas analizadas de *S. epidermidis* formaron biopelícula, de ellas el 38,9% exhibieron un fenotipo hiperproductor.

En este contexto, varios trabajos han reportado que las cepas de *S. epidermidis* (de origen clínico o adquiridas en la comunidad) que expresan elevadas cantidades de biopelícula son portadoras del operón *icaADBC* (responsable de la producción del exopolisacárido PIA) (Melo y col., 2013; Greco-Stewart y col., 2013; Freitas y col., 2018). Es posible que los microorganismos bacterianos hiperproductores descritos en esta investigación mostraron *in vitro* elevados niveles de expresión del locus *icaADBC*, o expresaron mecanismos adicionales en el desarrollo de biopelícula que originaron cepas altamente formadoras de matriz extracelular, entre las que se pueden mencionar : 30FN (cantidad de biopelícula 9,0); 2FN(cantidad de biopelícula 9,9) y 32Cel (cantidad de biopelícula 10,5). Estos resultados permiten afirmar que las cepas de *S. epidermidis* estudiadas tienen la capacidad de desarrollarse formando

biopelícula, y que bajo esta condición demuestran diferencias fenotípicas significativas.

El desarrollo de biopelícula se considera un importante factor de virulencia en *S. epidermidis*, debido a que el mismo protege a los microorganismos bacterianos de la acción de los componentes del sistema inmune del hospedero (Nasr y col., 2012; Nunes y col., 2012). Estos resultados ponen en evidencia que el personal hospitalario puede favorecer la transmisión de los microorganismos bacterianos hacia el paciente susceptible durante la atención clínica. Ante este escenario, la presencia de *Staphylococcus* con capacidad de desarrollar biopelícula, en el personal de médicos y enfermeras eventualmente podría favorecer la instauración de procesos infecciosos persistentes en la Emergencia de Adultos.

Otro hallazgo importante en esta investigación fue la capacidad de las cepas de *S. epidermidis* formadoras de biopelícula, de producir concentraciones de componentes amiloides (entre 6,2 y 8,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), siendo algunas de estas: 31M (7,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 33 FN (8,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 1M (6,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 32M (6,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 30FN (6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 32CEL (6,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) respectivamente. Reportes recientes han descrito que estas estructuras facilitan la adhesión bacteriana a la fibronectina y laminina presentes en la matriz extracelular del tejido, y activan la respuesta inmune del hospedero (Schwartz y Boles, 2013; Romero y Kolter, 2014). Es posible que la expresión de componentes amiloides en las cepas estudiadas en esta investigación, colonizaran con facilidad al personal clínico que presta atención sanitaria, permitiendo de esta manera demostrar en portadores asintomáticos, la presencia de cepas *S. epidermidis* con características fenotípicas que favorecieron su permanencia *in vivo*.

Al evaluar, la producción componentes amiloides y la formación de biopelícula respectivamente, las mismas mostraron variaciones mínimas (entre 6,2 y 8,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en relación a la cantidad de biopelícula formada por cada una de las cepas de *S. epidermidis*. En este análisis, se observó que las cepas de *S. epidermidis* productoras de biopelícula, pueden formar componentes amiloides de manera independiente a la cantidad de expolisacárido, como se ilustra en la (figura 11), debe señalarse que la

cantidad de biopelícula que exprese una cepa bacteriana, no se encuentra directamente relacionada con la producción de componentes amiloides.

(Wang y col., 2011) en un estudio reportaron que concentraciones medias (10  $\mu\text{g/mL}$ ) de componentes amiloides promueven el desarrollo de biopelícula en *S. epidermidis*, por el contrario, elevadas cantidades de estas estructuras (100  $\mu\text{g/mL}$ ) originan el desprendimiento del exopolisacárido. Posiblemente, las proporciones de componentes amiloides expresadas por las cepas analizadas fueron las requeridas para iniciar la formación de biopelícula *in vitro*, originando de esta manera los fenotipos observados (hipo e hiperproductor). Por otra parte, se conoce que los componentes amiloides facilitan la adhesión de los microorganismos bacterianos a materiales inertes (Chapman y col., 2003). Es por ello que la existencia de cepas *S. epidermidis* con las características fenotípicas antes descritas podría favorecer en primer lugar, la colonización de dispositivos médicos invasivos, causando procesos infecciosos persistentes asociados a la atención sanitaria, y en segundo lugar, su permanencia en las diferentes superficies de la Emergencia de Adultos (camas, equipos de soporte vital, entre otros).

Finalmente, en este trabajo se pudo establecer que la formación de biopelícula es independiente del origen de los aislamientos y de la producción de componentes amiloides. Es probable que la expresión de mecanismos que favorecen el desarrollo de exopolisacárido en las cepas estudiadas sea una condición inherente del microorganismo y que la misma esté regulada por factores del microambiente bacteriano (pH, osmolaridad, temperatura, oxígeno, nutrientes, entre otros). En consecuencia, los resultados mostrados en esta investigación evidencian que en la Emergencia de Adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) reside una población bacteriana con adaptaciones importantes al ambiente y en las áreas donde se desarrollan. Por lo tanto, la formación de biopelícula y la producción de componentes amiloides constituyeron las bases para el establecimiento exitoso de *S. epidermidis* en el ambiente hospitalario.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- El 69,2% (18/26) de las cepas analizadas de *S. epidermidis* formaron biopelícula, de ellas el 38,9% (7/18) exhibieron un fenotipo hiperproductor.
- Todos los aislados de *S. epidermidis* que desarrollaron biopelícula tuvieron la capacidad de producir componentes amiloides.
- No se encontró una relación estadística significativa entre la formación de biopelícula y la producción de componentes amiloides.
- Estos resultados sugieren que la formación de biopelícula y la producción de los componentes amiloides fueron condiciones que favorecieron la colonización del personal médico por cepas de *S. epidermidis*, las cuales expresan características que facilitan su colonización en dispositivos inertes, que contribuyen con su potencial patógeno.

## RECOMENDACIONES

El presente estudio puede considerarse como punto de partida para realizar nuevas investigaciones acerca de la expresión de componentes amiloides en cepas formadoras de biopelícula, por lo cual se recomienda:

- Iniciar una vigilancia y control del personal médico y de enfermería de la Emergencia de Adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) siendo estos portadores asintomáticos de este género bacteriano.
- Realizar de forma periódica aislados microbiológicos para la detección de microorganismos presentes en el personal médico y de enfermería de la Emergencia de Adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA).
- Fomentar la asepsia en las superficies del ambiente hospitalario, así como del personal que labora en dichas instituciones, como el uso correcto de instrumental, materiales y equipos, sin contaminarlos, siendo ellos los principales portadores de estos microorganismos, generando así una diseminación cruzada a los pacientes que reciben atención médica.
- Realizar la cuantificación de dichos componentes con el uso de otros colorantes indicadores, tal es el caso de la Cúrcuma, donde se ha descrito que también presenta propiedades específicas de unión a componentes amiloides.

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

- Aielloa, A., Cimiottib, J., Della-Lattac, P., y Larson, E. (2003). A comparison of the bacteria found on the hands of ‘homemakers’ and neonatal intensive care unit nurses. *Journal of Hospital Infection*. 54, 310-315.
- Álvarez M., Velazco E., Nieves B., Alviarez E., Araque M., Salazar E., y col. (2008). Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas de una unidad de alto riesgo neonatal. *Kasmera*. 36(1), 7 -16.
- Ambalam, P., Kondepudi, K., Nilsson, I., Wadstro, T y Ljungh, A. (2012). Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of Lactobacillus strains. *Federation of European Microbiological Societies*. 333, 10-19.
- Barreto, S., Zambrano, M., y Araque, M. (2009). Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas. *Investigación Clínica*. 50(2), 221 – 229.
- Becker, K., Heilmann, C., y Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(4), 870–926.
- Büttner, H., Mack, D., y Rohde, H. (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5(14), 1-15.
- Cerca, N., Martins, S., Pier, G., Oliveira, 1R., y Azeredo J. (2005). The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. *National Institute Of Health Public Access*. 156(5-6), 650–655.
- Cue, D., Lei, M., y Lee, C. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers in Cellular and infection microbiology*. 2(38), 1-13.
- Cui, B., Smooker, P., Rouch, D., Daley A., y Deighton, M. (2013). Differences between Two Clinical *Staphylococcus capitis* Subspecies as Revealed by

- Biofilm, Antibiotic Resistance, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiling. *51*(1), 9-14.
- Chapman, M., Robinson, L. Pinkner, J., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., y col. (2003). Role of *Escherichia coli* Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *National Institute Of Health Public Access*. .295(5556), 851–855.
- Cheung, G., Joo, H., Chatterjee, S., y Otto M. (2014). Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. *National Institute Of Health Public Access*. 38(4), 698–719.
- Danuta L., Pacha J y Danuta I. (2009) Methicillin resistance of airborne coagulase-negative staphylococci in homes of persons having contact with a hospital environment. *American Journal of Infection Control*. 37(3), 177-181.
- De Silva, G., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, R., Wilkinson, A., Day, N., y Peacock, S.(2002). The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal Of Clinical Microbiology*. 40(2), 382-387.
- Donlan, R. (2012). Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (2), 277-281.
- Freitas A., Lopes N., Oliveira F., Brás S., Franc Á., Vasconcelos C., y col. (2018). Comparative analysis between biofilm formation and gene expression in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Future Microbiology*. 10.2217/fmb-2017-0140 C.
- Greco-Stewart V., Ali H., Kumaran D., Kalab M., Rood I., de Korte D., y col. (2013), Biofilm formation by *Staphylococcus capitis* strains isolated from contaminated platelet concentrates. *Journal of Medical Microbiology*. (62), 1051–1059.
- Hira, V., Kornelisse, R., Sluijter, M., Kamerbeek, A., Goessens, W., Groot, R., y col. (2012). Colonization Dynamics of Antibiotic-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Neonates. *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (2), 595–597.

- Hira, V., Sluijter, M., Goessens, W., Ott, A., Groot, R., Hermans, P., y col. (2010). Coagulase-Negative Staphylococcal Skin Carriage among Neonatal Intensive Care Unit Personnel: from Population to Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(11), 3876-3881.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee C., y Stanley-Wall, N. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology*. 39, (5), 649-669.
- Hurtado J. (2010). Diseño de Investigación. *En el proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación*. pp. 133-151. Bogotá-Caracas: Ediciones Quirón.
- Kimizuka, R., Kato, T., Hashimoto, S., Okada, Y., Okuda, K., y Ishihara, K. (2009). Congo Red-binding Protein in Rough-phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is Amyloid-like Fiber. *Bull Tokyo Dent Coll*. 50(1), 23-29.
- Koneman E., Winn W., Allen S., Janda W., Procop G., Woods G. y col. (2013). *Diagnóstico Microbiológico*. 6 Edición. Buenos Aires: Panamericana.
- Kristi, F., Del Pozo, L., y Patel, R. (2008). From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 21(1), 111-133.
- Laverty, G., Gorman, S., y Gilmore, B. (2013). Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiology*. 8(4), 509-524.
- Lis D., Pacha, J., y Idzik D. (2009). Methicillin resistance of airborne coagulase-negative staphylococci in homes of persons having contact with a hospital environment. *American Journal of Infection Control*. 37(3), 177-182.
- Longauerova, A. (2006). Coagulase negative Staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratisl Lek Listy*. 107 (11-12), 448-452.
- Macintosh, R., Brittan, J., Bhattacharya, R., Jenkinson, H., Derrick, J., Upton, M., y col. (2009). The Terminal A Domain of the Fibrillar Accumulation-Associated Protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* Mediates Adhesion to Human Corneocytes. *Journal of Bacteriology*. 191(22), 7007-7016.

- Madsen, J., Burmolle, M., Hansen, L., y Sorensen, S. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65, 183–195.
- Makki, A., Sharma, S., Duggirala, A., Prashanth, K., Garg, P., y Das, T. (2011). Phenotypic and Genotypic Characterization of Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) Other than *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Ocular Infections. *Investigative Ophthalmology*
- Melo P., Ferreira L., Nader Filho A., Zafalon L., Vicente H., 3, Souza V. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology.* 44(1), 119-124.
- Moretro, T., Hermansen, L., Holck, A., Sidhu, M., Rudi, K., y Langsrud, S. (2003). Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among Staphylococci from Food and Food Processing Environments. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(9), 5648-5655.
- Nasr R., AbuShady H., y Hussein H. (2012). Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* (13), 269–274.
- Nunes, Z., Botelho, A., Asensi, M., Gomes, M., Fracalanza, S., y Figueiredo, A. (2012). Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from hospital indoor air and a comparative analysis between airborne and inpatient isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology.* 61, 1136–1145.
- Ogara, J. (2007). *Ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Microbiological Societies.* (270), 179-188.
- Oliveira A., y Cunha M. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *Research Notes.* 3:260.
- O'Toole, G. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments.* 47.

- Periasamy, S., Joo, H., Duong, A., Bach, T., Tan, V., Chatterjee, S., y col. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *PNAS*. *109* (4), 1281–1286.
- Piette, A., y Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*. *134*, 45-54.
- Rapsinski, G., Wynosky-Dolfi, M., Oppong G., Tursi, S., Wilson, P., Brodsky, I., y col. (2015). Toll-Like Receptor 2 and NLRP3 Cooperate To Recognize a Functional Bacterial Amyloid, Curli. *Infection and Immunity*. *83*(2), 693-701.
- Rashid Z., Sattar A., Qureshi M, Farzana K, Rashid F., y Murtaza G. (2012). Nasal carriage of staphylococci in medical personnel, sanitary workers and non-medical personnel. *Latin American Journal of Pharmacy*. *31* (10), 1496-500.
- Rohde, H., Burandt, E., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski C., Wurster, S., y col. (2010). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Elsevier*. *28*, 1711-1720.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., y Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *PNAS*. *107*(5), 2230-2234.
- Romero, D., y Kolter, R. (2014). Functional amyloids in bacteria. *International Microbiology*. *17*, 65-73.
- Sabino, C. (1992). El proceso de investigación. Caracas: Panapo. p 81.
- Schommer, N., Christner, M., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., Aepfelbacher, M., y Rohde, H. (2011). *Staphylococcus epidermidis* Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation to Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1. *Infection and Immunity*. *79*(6), 2267-2276.
- Schwartz, K., Syed, A., Stephenson, R., Rickard, A., y Boles, B. (2012). Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. (2012). *PLoS Pathogens*. *8* (6), 1-11.
- Schwartz, K., y Boles, B. (2013). Microbial Amyloids—functions and interactions within the host. *National Institute Of Health Public Access*. *16* (1), 1-13.

- Soto S., Smithson A., Horcajada P., Martinez J., Mensa J., y Vila J. (2006). Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogeny *Escherichia coli*. ***Clinical Microbiology and Infection***. 12(10), 1021-1045.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T., y Geoghegan, J. (2014). Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. ***Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*** . 4 (171), 1-10.
- Syed, A., y Boles, R. (2014). Fold modulating function: bacterial toxins to functional amyloids. ***Frontiers in microbiology***. 5 (401), 1-9
- Taglialegna, A, Lasa, I y Valle, J. (2016). Amyloid Structures as Biofilm Matrix Scaffolds. ***Journal of Clinical Microbiology***. 198(19),2579-2588.
- Tajeddin E., Rashidan M., Razaghi M., Javadi S., , Somayeh J. Sherafat S., Masoud Alebouyeh M., y col. (2016). The role of the intensive care unit environment and health-care workers in the transmission of bacteria associated with hospital acquired infections. ***Journal of Infection and Public Health***. (9), 13-23.
- Ulger F., Dilek A., Esen S., Sunbul M., y Leblebicioglu H. (2015). Are healthcare workers' mobile phones a potential source of nosocomial infections? Review of the literature. ***Journal of infection in developing countries***. 9(10), 1046-1053.
- Ustun C., y Cihangiroglu M. (2015). Health care workers' mobile phones: a potential cause of microbial cross-contamination between hospitals and community. ***Journal of Occupational and Environmental Hygiene***. 9, 538-542.
- Van Gerven N., Klein R., Hultgren, S., y Remaut, H. (2015). Bacterial Amyloid Formation: Structural Insights into Curli Biogenesis. ***Trends in Microbiology***. 20(10), 1-14.
- Vandecasteele, J., Peetermans, W., Merckx, R., Rijnders B., y Van Eldere, J. (2002). Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. ***Clin Microbiol Infect***. 9(2), 114-119.

- Vásquez, D., Habimana, O., y Holck, A. (2013). Impact of Food-Related Environmental Factors on the Adherence and Biofilm Formation of Natural *Staphylococcus aureus* Isolates. *Curr microbiol.* 66, 110-121.
- Weisser, M., Schoenfelder, S., Orasch, C., Arber, C., Gratwohl, A., Frei, R., y col. (2010). Hyper variability of Biofilm Formation and Oxacillin Resistance in a *Staphylococcus epidermidis* Strain Causing Persistent Severe Infection in an Immunocompromised Patient. *Journal of Clinical Microbiology.* 48(7), 2407-2412.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Anexo 1. Secuencias genómicas de las modulinas fenol solubles  $\beta$ -1 y  $\beta$ -2 en *S. aureus* ATCC 6538**

>NZ\_CP020020.1:1130998-1131132 *S. aureus* ATCC 6538 B4602\_RS05785 beta-class phenol-soluble modulin  
ATGGAAGGTTTATTTAACGCAATTAAAGATACCGTAACTGCAGCAATTAA  
TAATGATGGCGCAAATTAGGCACAAGCATTGTGAGCATCGTTGAAAATG  
GCGTAGGTTTATTAGGTAAATTATTCGGATTCTAA

>NZ\_CP020020.1:1131189-1131323 *S. aureus* ATCC 6538 B4602\_RS05790 beta-class phenol-soluble modulin  
ATGACTGGACTAGCAGAAGCAATCGCAAATACTGTGCAAGCTGCACAAC  
AACATGATAGTGTGAAATTAGGCACAAGTATCGTAGACATCGTTGCTAAC  
GGTGTGGGTTTACTAGGTAAATTATTTGGATTCTAA

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

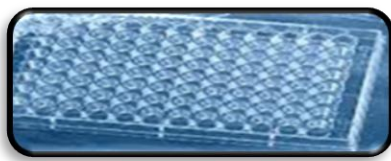
## Anexo 2. Metodología para la detección de biopelículas en *S. epidermidis*

### Preparación del inóculo bacteriano

Se transfiere con un asa bacteriológica de 3 a 4 colonias de cada cepa a un tubo con 3 mL de caldo TS y se compara con el patrón 0,5 de McFarland

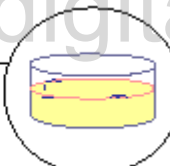
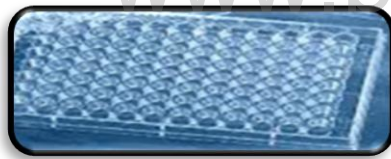


Se determinan las densidades ópticas (DO) alcanzadas por cada una de las cepas



Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de los inóculos a cada pozo de la placa de poliestireno para determinar la concentración celular y leer en el espectrofotómetro a 620 nm

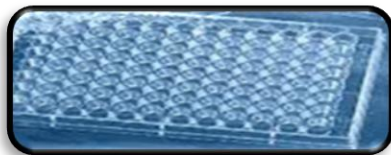
Los inóculos bacterianos obtenidos en el procedimiento anterior se utilizarán para el estudio de la formación de biopelícula



Adicionar 150  $\mu\text{L}$  del inóculo a cada pozo de la placa incubar a 37°C por 24 h

Verificar el crecimiento bacteriano en el espectrofotómetro a 620 nm, Descartar el medio de cultivo, lavar la placa con agua destilada y dejar secar por 20 minutos

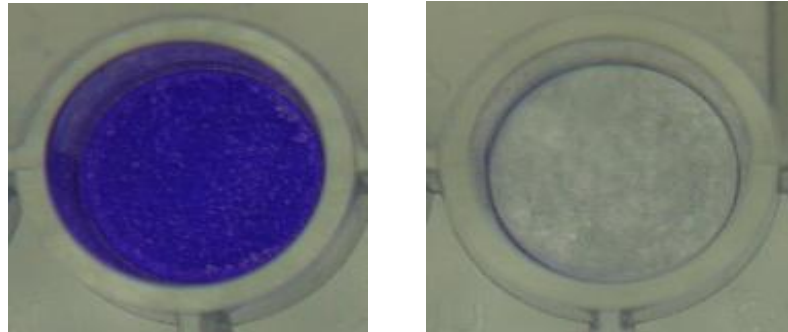
### Lectura



Adicionar a cada pozo 200  $\mu\text{L}$  de cristal-violeta al 1 % y dejar por 20 minutos

Descartar el exceso de colorante y lavar la placa con agua destilada por inmersión, la formación firme de botón adherido al fondo del pozo se consideró como una prueba positiva para la producción de biopelícula

**Anexo 3. Formación de biopelícula por cepas de *S. epidermidis* en microplacas.**



Aislado formador de biopelícula (a), no productor de biopelícula (b).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

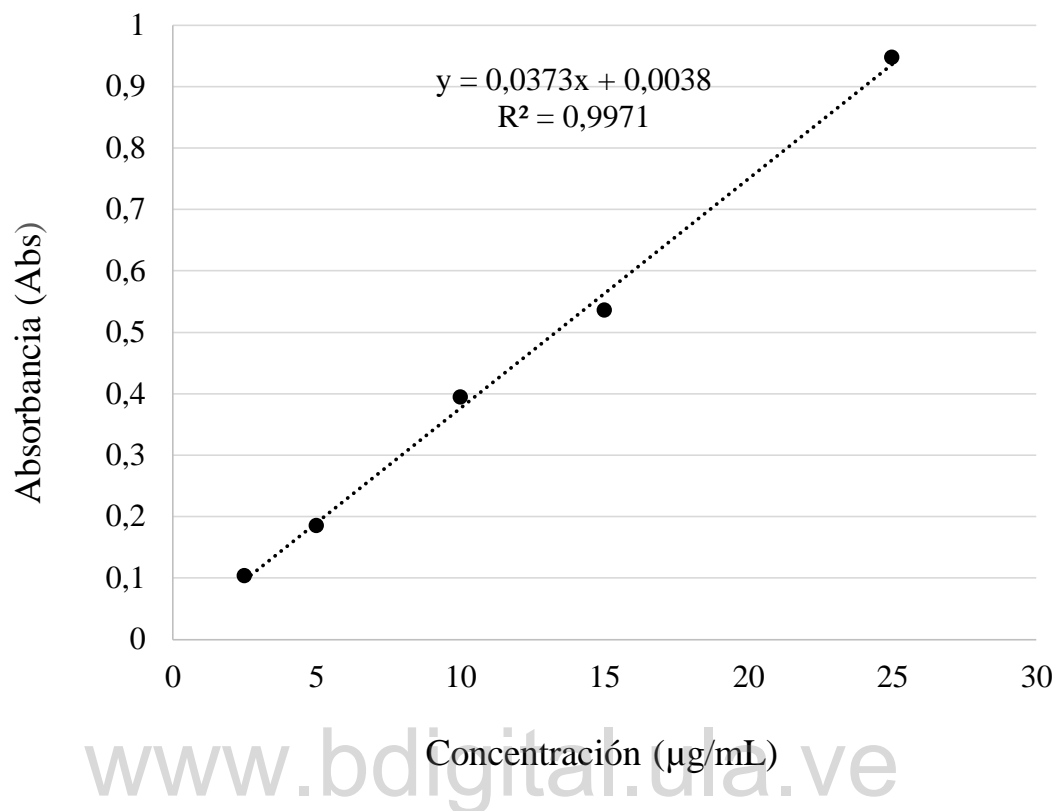
#### Anexo 4. Absorbancias obtenidas a partir de barridos espectrales.

Barrido Espectral		
Concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ )	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
(2,5 $\mu\text{g/mL}$ )	497.5	0.103
(5 $\mu\text{g/mL}$ )	497.0	0.185
(10 $\mu\text{g/mL}$ )	496.0	0.394
(15 $\mu\text{g/mL}$ )	494.5	0.535
(25 $\mu\text{g/mL}$ )	493.5	0.947

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

En el anexo 4, se representan las absorbancias obtenidas en los barridos espectrales realizados (700 a 300 nm) a partir de soluciones patrones de Rojo Congo en concentraciones crecientes. Las condiciones de trabajo se establecieron a una longitud de onda 496 nm y la solución patrón de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

### Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de componentes amiloides



A partir de los datos obtenidos en el espectrofotómetro se construyó una curva de calibración usando soluciones patrones del colorante Rojo Congo (entre 2,5 µg/mL y 25 µg/mL). La curva de calibración permitió representar gráficamente la señal (Absorbancia) que se mide del analito en función de la concentración del colorante.

## Anexo 6. Determinación de la producción y cuantificación de los componentes amiloides

### Preparación del inóculo bacteriano

Se transfiere con una asa bacteriológica de 3 a 4 colonias de cada cepa a un tubo de ensayo con 3 mL de caldo PNG, se compara con el patrón 0,5 de McFarland y se incuba a 37 °C durante 24 horas



Se transfirieron 1,5 mL de cada cultivo bacteriano a tubos de microcentrífuga estériles y se centrifugan a 9000 rpm por 10 minutos



Luego los paquetes celulares se resuspenden con 500µL de PBS (buffer fosfato salino pH 7,4) y se procede a agregar 40µL de Rojo Congo (10µg/mL); después se incuba a 37°C por un tiempo de 15 minutos



En seguida se procede a centrifugar nuevamente los tubos a 12000 rpm por 1 minuto, obteniéndose un paquete celular de color rojo y el sobrenadante



La cantidad de componentes amiloides unidos al colorante (sobrenadante) se mide en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 496 nm.