

# Caracterización fenotípica de *Staphylococcus epidermidis* aislado de pacientes con endoftalmitis

Eréndira Ruiz-Galindo,<sup>a\*</sup> Carlos Martínez-Canseco<sup>b</sup> y Rubén López-Revilla<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Oftalmología, Hospital General de México, SSA, México D.F., México

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Rehabilitación, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 14 de enero de 2010

Aceptado: 9 de abril de 2010

## RESUMEN

**Objetivo:** Conocer las características fenotípicas de *Staphylococcus epidermidis* aislado de endoftalmitis relacionadas con el implante de lente intraocular de metilmetacrilato, su capacidad para formar biofilm y adherencia a proteínas de matriz extracelular y poliestireno.

**Métodos:** Se estudiaron cinco cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de enfermos con endoftalmitis posterior la extracción del cristalino con implante de lente intraocular. Se investigó si estas cepas se adhieren a poliestireno, a colágena tipo I y a fibronectina, así como si las bacterias eran formadoras de biofilm. Al final se extrajeron las proteínas de superficie de las bacterias y se analizaron por electroforesis en gel de poliácridamida.

**Resultados:** Se encontró que las cinco cepas se unieron al poliestireno y que lo hicieron con mayor eficacia en la fase de crecimiento exponencial, con máxima adherencia a los 105 minutos; las cinco cepas se adherieron a fibronectina y solo dos (CV y EN) a colágena. Dos cepas (CV y EN) fueron débiles formadoras de biofilm. Se identificaron proteínas que por peso molecular corresponden con las informadas en la literatura como proteínas de unión a biomateriales.

**Conclusiones:** Las cepas estudiadas al no ser formadoras de biofilm tendrían que ser consideradas no patógenas, pero cumplen con el paso inicial de la patogenicidad, la adherencia, además de que fueron aisladas de un proceso infeccioso intraocular y produjeron endoftalmitis cuando fueron inoculadas en ojos de conejo.

## Palabras clave:

*Staphylococcus epidermidis*, endoftalmitis, biofilm, adherencia, proteínas de matriz extracelular, poliestireno

## SUMMARY

**Objective:** To carry out the phenotypic characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolated from endophthalmitis developed after cataract extraction and implantation of an intraocular lens. This bacteria produces a biofilm, adheres to polystyrene and host proteins such as collagen and fibronectin, significant virulence factors.

**Methods:** Five *S. epidermidis* strains were isolated from cases of endophthalmitis, they developed after crystalline extraction and implantation of an intraocular lens. We assessed if these strains adhere to polystyrene, to Type I collagen and to fibronectin and if bacteria produced biofilm. Finally, the bacterial surface proteins were obtained and analyzed using polyacrylamide gel electrophoresis.

**Results:** All five bacterial strains adhered to polystyrene, with a maximum adherence time of 105 min; they also displayed adherence to fibronectin but only two to collagen. Only two strains were weak biofilm producers. We identified proteins that by molecular weight are similar to those identified in the literature as proteins binding to biomaterials.

**Conclusions:** As the strains that we studied were not biofilm-forming they should be considered as non-pathogenic. Nevertheless, they meet the initial criteria of pathogenicity and adherence, aside from being isolated from an intraocular infectious process and being able to provoke endophthalmitis when inoculated in rabbit eyes.

## Key words:

*Staphylococcus epidermidis*, endophthalmitis, biofilm, adherence, host proteins, polystyrene

## Introducción

La endoftalmitis es una inflamación intraocular severa que ocasiona pérdida muy importante de la visión, permitiendo solo percibir luz en 73 % de los casos.<sup>1</sup> Las causas de la endoftalmitis son múltiples, las más frecuentes

son las infecciones relacionadas con procedimientos quirúrgicos intraoculares como extracción de catarata, vitrectomía y cirugía antiglaucoma.

Las bacterias grampositivas son las que con mayor frecuencia producen endoftalmitis, principalmente *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), un coco grampositivo

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Eréndira Ruiz-Galindo. Servicio de Oftalmología, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, 06726 México D.F., México. Correo electrónico: ereruga53@yahoo.com

coagulasa negativo. Los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) son constituyentes de la microbiota normal periocular y de la conjuntiva, se ha sugerido que tienen acceso al interior del ojo en el momento de la apertura del mismo durante los procedimientos quirúrgicos.<sup>2</sup> Las técnicas moleculares como la electroforesis en campos pulsados han permitido establecer la relación entre aislados de CoNS de la piel y conjuntiva y los obtenidos de origen intraocular.<sup>3</sup> En un estudio del humor vítreo de pacientes con endoftalmítis, en 50 % de los cultivos fueron aislados CoNS y de éstos *S. epidermidis* se aisló en 81.9 %, *S. lugdunensis* en 5.9 % y los aislados de los párpados fueron totalmente indistinguibles de los aislados en el interior del ojo en 67.7 %.<sup>4</sup>

En la última década se ha encontrado que *S. epidermidis* y otros CoNS son patógenos nosocomiales oportunistas<sup>5</sup> responsables de infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en estado crítico,<sup>6,7</sup> en quienes se implantan biomateriales<sup>8,9</sup> como catéteres, prótesis óseas, tubos de diálisis, válvulas y lentes intraoculares, entre otros.

La virulencia de *S. epidermidis* está ligada a su habilidad para colonizar la superficie de biomateriales formando una película o biofilm constituido por varias capas de células dentro de un material extracelular amorfo compuesto de exopolisacáridos, conocido como *slime* o glucocáliz;<sup>10</sup> una proporción de CoNS es capaz de producir un biofilm macroscópicamente visible en los tubos de cultivo. Christensen y colaboradores<sup>11</sup> demostraron que las cepas que producen biofilm causan más infecciones que las no productoras y sugirieron que la formación de biofilm es esencial en la patogenicidad de *S. epidermidis*.<sup>12</sup> El biofilm representa sociedades microbianas que tienen sus propias defensas y sistemas de comunicación,<sup>13</sup> estas comunidades celulares son resistentes a los antimicrobianos y solo pueden ser eliminadas quirúrgicamente.<sup>14</sup> Heilmann y colaboradores,<sup>15</sup> Gerke y colaboradores<sup>16</sup> y Mack<sup>17</sup> señalan al operón *ica* formado por cuatro genes (*ica A,D,B,C*) como el responsable en la síntesis de enzimas que actúan en la formación de la adhesina intercelular polisacárida (PIA) en cepas de *S. epidermidis* formadoras de biofilm. Actualmente la presencia de *ica* es un marcador de virulencia y discrimina cepas contaminantes de cepas infecciosas.<sup>18-20</sup>

La unión de los agentes patógenos a los tejidos del huésped representa el paso inicial en la patogénesis de las infecciones, con especificidad y tropismo tisular producido por interacciones adhesina-ligando. Los patógenos bacterianos primariamente extracelulares como los estafilococos se adhieren a componentes de la matriz extracelular del huésped y así inician la colonización. Esta adherencia se efectúa por adhesinas de la superficie de la bacteria que reconocen las moléculas de la matriz extracelular (fibronectina, fibrinógeno, colágena, elastina, etcétera); a estas adhesinas se les conoce como MSCRAMM. Patti y Höök<sup>21</sup> postulan que la patogenia de las infecciones bacterianas es multifactorial y la adherencia de la bacteria es un paso crítico en el desarrollo de la mayoría de las infecciones. El fibrinógeno es una proteína del plasma sanguíneo, blanco de muchas MSCRAMM. Nilsson y colaboradores<sup>22</sup> identificaron la proteína de unión a fibrinógeno (Fbe) y el gen que codifica

para la misma (*fbe*) en *S. epidermidis*; esta proteína tiene gran homología con la proteína ClfA de *S. aureus* que también se une a fibrinógeno.<sup>21,23</sup> Las adhesinas Fbe, SdrG, SdrF y SdrH son miembros de una familia de proteínas que contienen repetidos de serina-aspartato (SD)<sup>24-26</sup> e interactúan con proteínas de matriz extracelular. Embp es una proteína de unión a fibronectina,<sup>27</sup> GehD se une a colágena,<sup>28</sup> y ambas participan en la adherencia de *S. epidermidis*.

Todas las cepas de *S. epidermidis* son capaces de unirse directamente a la superficie de biomateriales por medio de las proteínas de superficie SSP1 y SSP2<sup>29,30</sup> o a través de la unión a proteínas de matriz extracelular presentes sobre la superficie del biomaterial. Patel y colaboradores<sup>31</sup> señalan que la adhesión inicial de esta bacteria se suprime en ausencia de proteínas séricas. La adherencia bacteriana es un requisito esencial en la patogenicidad de *S. epidermidis* y es seguida por la colonización de los implantes.

La adherencia *in vitro* de *S. epidermidis* a lentes intraoculares está determinada por el tipo de material del lente, pues la bacteria tiene mayor adherencia a superficies irregulares, los lentes Acrysof son más permisivos que los lentes de polimetilmetacrilato<sup>2,32,33</sup> al favorecer la adherencia de los microorganismos. Una vez que las bacterias se han adherido a la superficie del lente intraocular sufren modificaciones fenotípicas y genotípicas para formar biofilm y microcolonias que colonizan el lente y producen endoftalmítis. El propósito de este estudio fue hacer la caracterización fenotípica de cinco cepas de *S. epidermidis* aisladas de endoftalmítis, identificando la formación de biofilm, la adherencia a colágena, fibronectina y poliestireno, asumiendo que si el tropismo por el humor vítreo de *S. epidermidis* causante de endoftalmítis se debe a la adhesión bacteriana, las cepas aisladas expresarán las adhesinas para las principales moléculas de matriz extracelular del humor vítreo, la colágena tipo I y la fibronectina, conjuntamente con las adhesinas de unión al lente intraocular que está elaborado con polimetilmetacrilato.

## Material y métodos

**Cepas bacterianas.** Se estudiaron cinco cepas aisladas de cinco casos de endoftalmítis (CV, EN, ME, RP, SJ); las muestras se obtuvieron por vitrectomía vía pars plana en tres casos y en dos por vitrectomía en el momento de retirar el lente intraocular. Los aislados se identificaron por su actividad de coagulasa y por perfil bioquímico API ID 32 Staph (Analytab Products, Plainview, NY). Las cepas se conservaron en caldo cerebro-corazón con glicerol al 20 % a 70°C, y para su uso se sembraron en agar sangre y Luria. Como controles se usaron las cepas de *Staphylococcus aureus* FDA574 y Newman donadas por el Dr. Joseph L. Patti del Center for Extracellular Matrix Biology, Institute of Biosciences and Technology, University Texas A&M, Houston, Texas; la cepa de *Staphylococcus carnosus* TM300 fue donada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y la cepa de *Staphylococcus epidermidis* RP62A de la colección del CINVESTAV, México.

**Producción de biofilm.** Para este experimento se usaron como controles la cepa RP62A de *S. epidermidis*, formadora de biofilm, y la cepa TM 300 de *S. carnosus*, no formadora de biofilm. Para averiguar la producción de biofilm se usó el método en tubo de Christensen,<sup>10</sup> que consiste en colocar 2 ml de medio de soya tripticasa suplementada con glucosa a 0.25 % en tubo de vidrio, se inoculó una colonia bacteriana y se incubó toda la noche a 37 °C; se eliminó el contenido del tubo y se lavó dos veces con PBS, se agregaron 2 ml de safranina a 0.1 %; el tubo se rotó cuidadosamente para asegurar una tinción uniforme del material adherente, se eliminó el contenido y para secar el tubo se colocó boca-abajo. La prueba se consideró positiva cuando se observó la formación de una película teñida en la superficie interna del tubo.

**Preparación de la colágena tipo I y la fibronectina (Sigma).** Estas proteínas se diluyeron con regulador salina fosfato (PBS: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.018 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.010 M, NaCl 0.145 M, pH 7.4) que contenía 2 mg de albúmina sérica bovina en cada ml, para obtener concentraciones de cada una de las proteínas de 250 ng en un volumen de 50 µl.

**Preparación del inóculo bacteriano.** Se sembraron las cinco cepas (CV, EN, ME, RP, SJ) y los controles positivos para adherencia a colágena, a fibronectina y formación de biofilm (cepas FDA 574, Newman y RP62A, respectivamente) en agar sangre y se incubaron a 37 °C durante 24 horas (fase estacionaria de crecimiento), luego se sembró una colonia en caldo cerebro-corazón y se incubó en agitación constante por cuatro horas (fase exponencial de crecimiento). El cultivo se centrifugó y se resuspendió en PBS y se ajustó a 0.4 de absorbancia a 535 nm que equivale a  $4.95 \times 10^6$  células en 50 µl de la suspensión.

**Ensayos de unión a colágena tipo I y a fibronectina.** Se empleó el método usado por Wolz y colaboradores,<sup>34</sup> con algunas modificaciones. Para los ensayos de unión a estas proteínas se emplearon placas Falcon de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 50 µl de las soluciones de proteínas que contienen 250 ng de colágena tipo I y de fibronectina humanas; las placas se incubaron a 37 °C durante 90 minutos y se lavaron dos veces con PBS, se agregaron 50 µl del inóculo bacteriano y se incubaron a 37 °C durante dos horas, se lavó dos veces con PBS, se fijaron las células adheridas con formaldehído a 25 %, se lavó con PBS y se tiñó con cristal violeta (50 µl en cada pozo), durante 30 minutos; se efectuaron tres o cuatro lavados con PBS. En cada pozo se agregaron 100 µl de PBS y se dejaron a temperatura ambiente durante una hora, se agitó durante dos minutos y se midió la absorbancia a 620 nm en un lector para ELISA.

Cada serie se efectuó por triplicado, se tomó un promedio de las tres lecturas y se restó la lectura del blanco para obtener el valor de adherencia de la bacteria a la proteína.

Se validó la adherencia bacteriana a la colágena y a la fibronectina empleando como controles positivos las cepas FDA 574 y Newman, respectivamente.

**Ensayo de unión a poliestireno.** Este ensayo fue efectuado en dos fases de crecimiento de la bacteria, en fase exponencial (cuatro horas de crecimiento) y en fase estacio-

naria (24 horas de crecimiento). Se usaron placas Falcon construidas con poliestireno y con el objeto de establecer una cinética en la unión se siguieron los siguientes pasos: cada pozo se inoculó con 50 µl del inóculo bacteriano, las placas se incubaron a 37 °C y cada 15 minutos se retiró el inóculo bacteriano hasta los 135 minutos, las bacterias adheridas a la placa se fijaron con formaldehído a 25 %, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con cristal violeta (50 µl en cada pozo) durante 30 minutos y se efectuaron tres lavados con PBS. En cada pozo se agregaron 100 µl de PBS y se dejó a temperatura ambiente durante una hora, Se agitó durante dos minutos y se midió la absorbancia a 620 nm en un lector para ELISA.

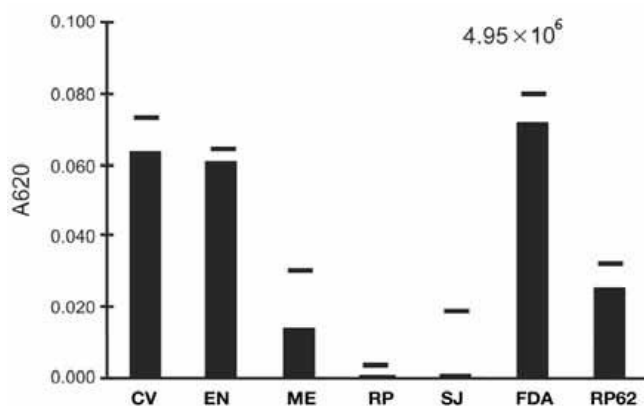
Cada serie se efectuó por triplicado y se tomó un promedio de las tres lecturas para graficar la cinética de unión a poliestireno.

**Obtención de proteínas de membrana externa.** Las proteínas fueron obtenidas de dos fases de crecimiento de la bacteria, exponencial y estacionaria. Se cultivó la bacteria toda la noche en infusión cerebro corazón, 1 ml de la suspensión bacteriana se trató con lisostafina (100 µg en 150 µl de regulador TE) por cuatro horas a 37 °C, se centrifugó a  $14\,000 \times g$  por 15 minutos. La pastilla se suspendió en 250 µl de PBS 10 mM a pH de 7.3 con NaCl 150 mM conteniendo 4000 unidades de sulfato de polimixina B por ml y se incubó en hielo durante 25 minutos; se centrifugó a  $16\,000 \times g$  a 4 °C por cinco minutos. La pastilla se suspendió en 250 µl de PBS frío y sonicada con dos pulsos de 15 segundos, se centrifugó a  $2000 \times g$  por 2 minutos para eliminar las células rotas, nuevamente se centrifugó a  $16\,000 \times g$  por 30 minutos para formar una pastilla de productos de membrana. Se suspendió la pastilla en 250 µl de PBS que contenía Triton X-100 a 1 % y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos, se centrifugó a  $16\,000 \times g$  a temperatura ambiente por 30 minutos y se suspendió la pastilla en 60 µl de PBS. Las proteínas fueron disueltas en el regulador de muestra (SDS 10 %, ditiotritol 5 %, glicerol 40 % y bromofenol azul en Tris HCl 1 M), la solución fue hervida por tres minutos. Se cargaron 15 µl de proteína (10 489-10 728 µg) en un gel de poliacrilamida a 10 % para analizarlas por electroforesis. El corrimiento se hizo a 50 volts durante 35 minutos y a 90 volts durante una hora con 30 minutos. El marcador Broad Range de Bio-Rad se tomó como referencia para calcular el peso molecular de las proteínas.

## Resultados

**Microbiología:** las cinco cepas (CV, EN, ME, RP, SJ) fueron cocos grampositivos, coagulasa negativos, identificadas como *Staphylococcus epidermidis*.

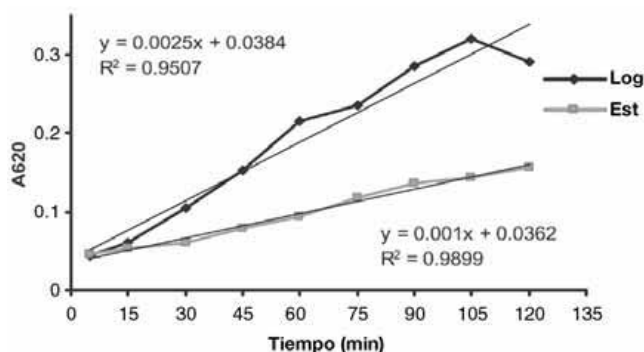
**Adherencia a colágena:** las cepas ME, RP, SJ no se adhirieron, las cepas CV y EN mostraron un patrón de adherencia semejante al de la cepa FDA574 y tomando la adherencia de ésta, que es el control positivo, como 100 %, la adherencia de la cepa CV fue de 87.5 % y la de la cepa EN de 85 %; la cepa RP62A formadora de biofilm tuvo una adherencia de 20 % (Figura 1).



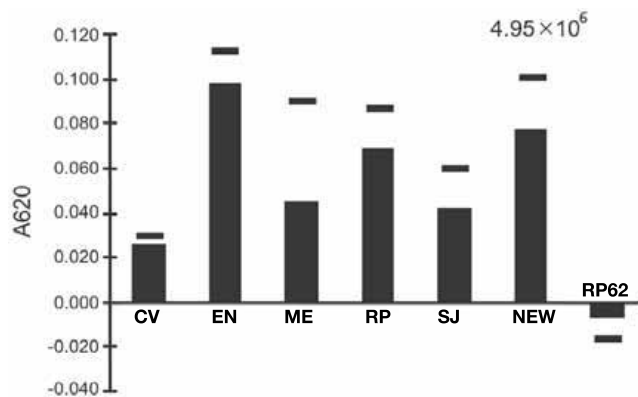
**Figura 1.** Adherencia a colágeno I de las cinco cepas de estudio, de la cepa FDA (control positivo en este ensayo) y de la cepa RP62A (productora de biofilm). La adherencia de las cepas CV y EN es semejante a la del control positivo, las cepas RP62A y ME tiene mínima adherencia y las otras dos no se adhirieron a esta proteína.

**Adherencia a fibronectina:** todas las cepas tuvieron capacidad de unión a fibronectina en mayor o menor porcentaje –RP 88 %, ME 58.5 %, SJ 54.5 %, CV 32.5 %– pero destacaron la cepa EN, que tuvo una adherencia mayor que la control y RP62A, que no tuvo adherencia a esta proteína (Figura 2).

**Adherencia a poliestireno:** todas las cepas se adhieren con mayor eficacia en la fase de crecimiento exponencial, mostrando una relación 2-3 veces mayor que en la fase estacionaria, lo que las diferencia de la cepa RP62A, que tuvo un patrón de adherencia al poliestireno semejante en ambas fases. En la cinética de adherencia se observó que la curva fue ascendente, logrando el máximo de adherencia a los 105 minutos en las cepas problemas, mientras que en la cepa RP62A la curva de adherencia fue plana a partir del minuto 45 (Figuras 3 y 4).



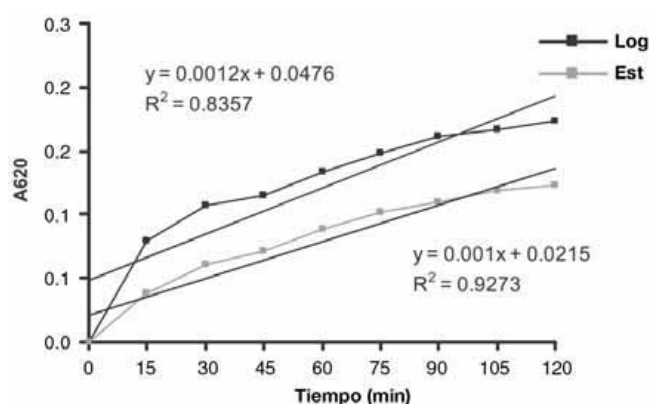
**Figura 3.** Cinética de adherencia a poliestireno de la cepa CV en crecimiento logarítmico y estacionario, que muestra cómo se incrementa su adherencia en relación con el tiempo de exposición, logrando la máxima adherencia en el minuto 105. Como se puede ver en la gráfica, la pendiente ( $y = 0.0025$ ) en la fase de crecimiento logarítmico es mayor que la pendiente ( $y = 0.001$ ) en la fase de crecimiento estacionario, esto indica la eficiencia de la adherencia en la fase de crecimiento logarítmico.



**Figura 2.** Adherencia a fibronectina de las cinco cepas de estudio, de la cepa Newman control positivo en este ensayo y la cepa RP62A productora de biofilm. Todas las cepas se adhirieron a esta proteína, la cepa EN lo hizo con mayor eficacia que la cepa control, la cepa RP62A no se adhirió y la cepa CV presenta pobre adherencia.

**Producción de biofilm:** la cepa RP62A fue la mayor productora de biofilm en tubo y se tomó como punto de comparación para las demás, pudiéndose observar que las cepas CV y EN fueron débiles productoras de biofilm y las restantes no fueron productoras de biofilm (Figura 5).

**Proteínas de superficie:** el patrón de proteínas de membrana externa fue semejante en todas las cepas. En la fase de crecimiento exponencial se identificaron las proteínas de mayor expresión y por su peso molecular 38, 45, 60 y 140 kDa son las que participan en la adherencia a poliestireno; estas proteínas continuaron expresándose en la fase estacionaria. Las demás proteínas expresadas tendrían que ser caracterizadas para identificar las que reconocen proteínas como colágeno tipo I y fibronectina. Es importante hacer esta caracterización en un futuro próximo. (Figura 6).



**Figura 4.** Cinética de adherencia a poliestireno de la cepa RP62A en crecimiento logarítmico y estacionario, que muestra un perfil de adherencia plano en ambas fases de crecimiento, no se incrementa la adherencia con el tiempo de exposición. La pendiente ( $y = 0.0012$ ) en la fase de crecimiento logarítmico es semejante a la pendiente ( $y = 0.001$ ) en la fase de crecimiento estacionario.



## Discusión

Los CoNS producen infecciones asociadas con el implante de biomateriales y se considera que la adherencia de la bacteria al biomaterial es importante en el proceso infeccioso, este paso es mediado por moléculas de la superficie de la célula bacteriana que se unen a componentes de la matriz extracelular y al biomaterial ocasionando la colonización e invasión tisular.<sup>21,29,32</sup> Galdart y colaboradores<sup>19</sup> señalan que ninguna de las cepas estudiadas se adhirió de manera significativa a colágena o fibronectina y la severidad de la infección por *S. epidermidis* se redujo al administrar anticuerpos antiFbe. Guo y colaboradores<sup>35</sup> y otros autores<sup>36</sup> indican que las proteínas de unión de *S. epidermidis* a proteínas de matriz extracelular son importantes en la patogenia de infecciones asociadas a biomateriales, esto tiene relación con el resultado obtenido en este estudio, ya que las cinco cepas se adhirieron significativamente a fibronectina aunque solo dos cepas se adhirieron a colágena.

Tres cepas no produjeron biofilm y dos fueron débiles formadoras de biofilm, lo que difiere de lo publicado por otros autores,<sup>20,37-40</sup> que consideran que el biofilm es el factor de virulencia más característico de *S. epidermidis* cuando hay el implante de un biomaterial y diferencia cepas patógenas de contaminantes, sin embargo, esta característica fenotípica no se presentó en las cepas estudiadas y creemos que puede explicarse por la capacidad que tiene la bacteria de cambiar rápidamente sus características fenotípicas, fenómeno conocido como "variación de fase",<sup>41</sup> de tal manera que para algunos autores la detección del gen *ica* es la prueba más confiable para discriminar cepas virulentas de las no virulentas,<sup>18-20,42</sup> pues el control genético de la síntesis de biofilm es efectuado por el operón *ica*.<sup>41</sup> Baaldassarri y colaboradores<sup>43</sup> sugieren que el biofilm enmascara moléculas importantes para la adherencia de *S. epidermidis* a proteínas del huésped. En este trabajo, las cepas fueron débiles formadoras o no formadoras de biofilm y se unen

mucho mejor a fibronectina y colágena que la cepa RP62A, formadora de biofilm, resultado relacionado con la opinión de este autor.

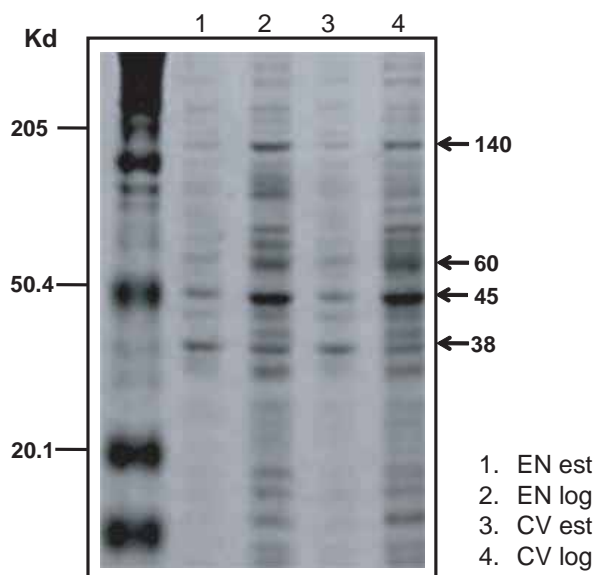
Pinna y colaboradores<sup>32</sup> observaron que los lentes Acrysof son más permisivos para la adherencia de la bacteria por su superficie irregular que los lentes de polimetilmetacrilato (poliestireno), sin embargo, en este estudio las cinco cepas se adhirieron al poliestireno en forma eficaz y la mayor adherencia se relacionó con el tiempo de exposición.

Las proteínas de la superficie bacteriana identificadas por su mayor expresión por electroforesis en gel de poliácridamida fueron de 140, 60, 45 y 38 kD;<sup>26,27,29,30,32</sup> las tres últimas corresponden a proteínas informadas para la adherencia a poliestireno. La proteína de 60 kD, considerada como una de las adhesinas de unión al plástico, fue identificada en mutantes de *S. epidermidis* O-47; las mutantes fueron logradas por la inserción del transposón Tn917.<sup>15</sup> Se identificó a la proteína de 140 kD como la responsable del proceso de acumulación de las células bacterianas, otro paso importante en las infecciones causadas por *S. epidermidis*.<sup>44</sup> La expresión de estas proteínas fue más significativa en la fase de crecimiento logarítmico. Timmerman y colaboradores<sup>30</sup> señalaron que muchas proteínas poseen la propiedad de unirse a biomateriales, pero las proteínas de superficie de *S. epidermidis* SSP1 y SSP2 son más competentes y participan en la unión directa de la bacteria al biomaterial en ausencia de proteínas plasmáticas; estas proteínas no fueron identificadas en las cepas estudiadas.

En la literatura consultada, la producción de biofilm se considera un marcador para discriminar *S. epidermidis*, patógeno de la microbiota normal; las cepas estudiadas que no son formadoras de biofilm tendrían que ser consideradas



**Figura 5.** Formación de biofilm de dos cepas de estudio y de las cepas control, en comparación con la cepa RP62A, buena productora de biofilm, y la cepa *carnosus*, no productora.



**Figura 6.** SDS-PAGE de proteínas de superficie de las cepas CV y EN. Se señalan las proteínas de mayor expresión que corresponden por peso molecular a proteínas de adherencia a poliestireno.

no patógenas, sin embargo *S. epidermidis* fue la única bacteria aislada de un proceso infeccioso intraocular que al inocularse en el humor vítreo de ojos de conejos provocó el mismo proceso infeccioso intraocular. Esta observación confirma que las cinco cepas estudiadas cumplen con el paso inicial para el desarrollo de la infección: la adherencia de la bacteria a proteínas de matriz extracelular y poliestireno.

## Referencias

- Rowsey JJ, Newson DL, Sexton DJ, Harms WK. Endophthalmitis: current approaches. *Ophthalmol* 1982;89:1055-1066.
- Kodjickain L, Roques C, Campanac C, Doleans A, Baillif S, Pellon G, et al. Biofilms à *Staphylococcus epidermidis* à la surface des implants intraoculaires. *J Fr Ophtalmol* 2005;28:224-230.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
- Bannerman TL, Rhoden DL, McAllister SK, Miller JM, Wilson LA. The source of coagulase-negative staphylococci in the endophthalmitis vitrectomy study. *Arch Ophthalmol* 1997;115:357-361.
- Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002;4:481-489.
- Domingo P, Fontanet A. Management of complications associated with totally implantable ports in patients with Aids. *AIDS Patient Care STDS* 2001;15:7-13.
- Ziebuhr W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib Microbiol* 2001;8:102-107.
- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994;19:231-245.
- Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. *Clin Microbiol Review* 1994;7:117-140.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982;37:318-326.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1983;40:407-410.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996-1006.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-1322.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappen-Scott HM. Microbial biofilms. *An Rev Microbiol* 1995;49:711-745.
- Heilmann Ch, Gerke Ch, Perdreaux-Remington F, Götz F. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* 1996;64:277-282.
- Gerke Ch, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998; 273:18586-18593.
- Mack D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* 1999; 43 (Supplement): S113-S125.
- Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:877-880.
- Galdabart JO, Allignet J, Tung H, Ryden C, El Solh N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* 2000;182: 351-355.
- García P, Benítez R, Lam M, Salinas AM, Wirth H, Espinoza C, et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol* 2004;53:67-72.
- Patti JM, Höök M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Current Opin Cell Biol* 1994; 6:752-758.
- Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1998;66:2666-2673.
- Bowden MG, Heuck AP, Ponnuraj K, Kolosova E, Choe D, Gurusiddappa S, et al. Evidence for the "dock, lock, and latch" ligand binding mechanism of the staphylococcal microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) SdrG. *J Biol Chem* 2008;283:638-647.
- Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:677-685.
- McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharmac Pharmacol* 2008;60:1551-1571.
- Hall AE, Patel PR, Domanski PJ, Prater BD, Gorovits EL, Syribeys PJ, et al. A panel of monoclonal antibodies recognizing the *Staphylococcus epidermidis* fibrinogen-binding MSCRAMM SdrG. *Hybridoma* 2007;26:28-34.
- Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2002;70:6805-6810.
- Bowden MG, Visai L, Longshaw CM, Holland KT, Speziale P, Hook M. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J Biol Chem* 2002;277:43017-43023.
- Veenstra GJ, Cremers F, Van Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 1996;178:537-541.
- Timmerman CP, Fleer A, Besnier JM, De Graaf L, Cremers F, Verhoef J. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 1991;59:4187-4192.
- Patel JD, Ebert M, Ward R, Anderson JM. *S. epidermidis* biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *J Biomed Mater Res* 2007;82A:742-751.
- Pinna A, Zanetti S, Sechi LA, Usai D, Falchi MP, Carta F. In vitro adherence of *Staphylococcus epidermidis* to polymethyl methacrylate and acrysof intraocular lenses. *Ophthalmol* 2000;107:1042-1046.
- Kodjickain L, Burillon C, Chanloy C, Bostvironnois V, Pellon G, Mari E, et al. In vivo study of bacterial adhesion to five types of intraocular lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3717-3721.
- Wolz Ch, McDevitt D, Foster TJ, Cheung AL. Influence of agr on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect Immun* 1996;64:3142-3147.
- Guo B, Zhao X, Shi Y, Zhu D, Zhang Y. Pathogenic implication of a fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* in a rat model of intravascular-catheter-associated infection. *Infect Immun* 2007;75:2991-2995.
- Montanaro L, Arciola CR, Borsetti E, Collamati S, Baldassarri L. Detection of fibronectin-binding protein genes in *Staphylococcal* strains from peri-prosthesis infections. *Microbiol* 1999;22:331-336.
- Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by *Staphylococcal* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:3235-3238.
- Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* 1999;67:2627-2632.
- O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; 50:582-587.
- Duggirala A, Kenchappa P, Sharma S, Peeters JK, Ahmed N, Garg P, et al. High-resolution genome profiling differentiated *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with ocular infections and normal individuals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3239-3245.
- Ziebuhr W, Heilmann C, Götz F. Detection of the intercellular adhesin gene *clu(ica)* and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 1997;65:890-896.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001;39:2151-2156.
- Baldassarri L, Donelli G, Gelosia A, Simpson AW, Christensen GD. Expression of slime interferes with in vitro detection of host protein receptors of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1997;65:1522-1526.
- Hussain M, Herrmann M, Von Eiff Ch, Perdreaux-Remington F, Peters G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 1997;65:519-524.