



Efecto de los péptidos LL-37 sobre la expresión de proteínas del Quorum
sensing en cepas
de *S. aureus* y *S. epidermidis*

Sergio Alejandro Gutierrez Riveros

Asesor

Liliana Constanza Muñoz

Grupo de Investigación Relaciones Microbianas y Epidemiológicas Aplicadas al
Laboratorio Clínico y Molecular (REMA)

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, D. C.

2019

ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE	2
ÍNDICE DE GRAFICAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE ANEXOS	7
GRÁFICAS DE ANEXOS	8
TABLAS DE ANEXOS	8
RESUMEN	9
OBJETIVOS	10
INTRODUCCIÓN	
11	
MARCO	TEORICO
13	
1. <i>Staphylococcus</i>	<i>sp.</i>
13	
a. <i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
13	
b. <i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
13	
2. Quorum	sensing
14	(QS)
a. <i>agrA</i>	
15	
b. <i>agrB</i>	
15	
c. <i>agrC</i>	
16	

d. *agrD*

16

3. Péptido LL-37
17

METODOLOGÍA

18

1. Determinar mediante herramientas de bioinformática los primers para los genes *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* que intervienen en el proceso de Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

a. Definir las secuencias consenso de cada uno de los genes 18

b. Comprobar de la especificidad de los primers 19

c. Diferenciar los genes autoinductores para QS en las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* 21

2. Identificar los genes del operon *agr* y los autoinductores que intervienen en el proceso de Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

a. Extracción de ADN de los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis* 22

b. Amplificación de los genes en estudio 22

c. Visualización de los productos de amplificación 23

3. Medir la expresión de los genes *agr* involucradas en el Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en ausencia y presencia de los péptidos LL-37 y DLL-37

a. Extracción de ARN 23

b. Síntesis del cDNA 23

c. Cuantificación de los ácidos nucleicos 23

d. Expresión de los genes 23

e. Análisis estadístico 24

RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFIA	
40	
ANEXOS	
45	

ÍNDICE DE GRAFICAS

Pag.

Grafica N° 1. Alineamiento de secuencias de agrA de *S. epidermidis*
19

Grafica N° 2. Alineamiento de secuencias de agrB de *S. epidermidis*
19

Grafica N° 3. Selección de primers para agrA de *S. epidermidis*
19

Grafica N° 4. Selección de primers para agrB de *S. epidermidis*
19

Grafica N° 5. Resultados del BLAST para el primer R de agrA *S. epidermidis*
20

Grafica N° 6. Resultados del BLAST para el primer F de agrA *S. epidermidis* 20

Grafica N° 7. Resultados del BLAST para el primer R de agrB *S. epidermidis*
21

Grafica N° 8. Resultados del BLAST para el primer F de agrB *S. epidermidis* 21

Grafica N° 9. Protocolo de amplificación para detección de genes por medio de
PCR convencional
22

Grafica N° 10. Protocolo de amplificación para detección de genes por medio
de PCR en tiempo real
24

Gráfica N° 11. Detección electroforética del gen agr A en cepas de *S. aureus*
26

Gráfica N° 12. Detección electroforética del gen AgrB en cepas de *S. aureus*
26

Gráfica N° 13. Detección electroforética del gen AgrC en cepas de *S. aureus*
26

Gráfica 14. Evaluación de la presencia del gen <i>AgrA</i> en cepas de <i>S. epidermidis</i>	27
Gráfica 15. Evaluación de la presencia del gen <i>AgrB</i> en cepas de <i>S. epidermidis</i>	27
Gráfica N° 16. Electroforesis de productos de PCR para detección de AIP tipo I en <i>S. epidermidis</i>	27
Gráfica N° 17. Electroforesis de productos de PCR para detección de AIP tipo II en <i>S. epidermidis</i>	28
Gráfica N° 18. Tipificación de los AIP`s I y II de <i>S. aureus</i>	28
Gráfica N° 19. Tipificación de los AIP`s III y IV de <i>S. aureus</i>	28
Gráfica N° 20. Análisis de expresión del gen <i>agrA</i> en la cepa ATCC USA300	29
Gráfica N° 21. Análisis de expresión del gen <i>agrA</i> en la cepa de <i>S. aureus</i> COL81	30
Gráfica N° 22. Análisis de expresión del gen <i>agrA</i> en la cepa de <i>S. epidermidis</i>	22-6 30
Gráfica N° 23. Análisis de expresión del gen <i>agrA</i> en la cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31
Gráfica N° 24. Análisis de expresión del gen <i>agrA</i> en la cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	31
Gráfica N° 25. Análisis de expresión del gen <i>agrB</i> en la cepa de <i>S. epidermidis</i>	22-6 32

Gráfica N° 26. Análisis de expresión del gen <i>agrB</i> en la cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	32
Gráfica N° 27. Análisis de expresión del gen <i>agrB</i> en la cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	33
Gráfica N° 28. Análisis de expresión del gen <i>agrB</i> en la cepa de <i>S. aureus</i> COL81	33
Gráfica N° 29. Análisis de expresión del gen <i>agrB</i> en la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC USA300	34

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla Nº 1. Primers para los genes <i>agrA</i> y <i>agrB</i> de <i>S. epidermidis</i>	25
Tabla Nº 2. Presencia de los genes <i>agrA</i> <i>agrB</i> y <i>agrC</i> en los aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> .	28
Tabla Nº 3. Tipificación de los AIP's de las cepas estudiadas	29
Tabla Nº 4. Resultados del cambio en la expresión de los genes <i>agrA</i> y <i>agrB</i> después del tratamiento con los péptidos DLL-37 y LL37-1	35

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO N° 1. Nomenclatura de las cepas empleadas en el estudio y su origen	45
ANEXO N° 2. Estandarización de PCR convencional	47
ANEXO N° 3. Confirmación molecular de la identidad de las cepas	49
ANEXO N° 4. Resultados obtenidos en las PCR convencionales	50

GRÁFICAS DE ANEXOS

Pag.

Gráfica N° 1. Confirmación de género y especie para *S. epidermidis*
49

TABLAS DE ANEXOS

Tabla N° 1. Aislamientos clínicos de *S. aureus* y su procedencia
45

Tabla N° 2. Aislamientos clínicos de *S. epidermidis* y su procedencia
46

Tabla N° 3. Presentación de resultados de PCR convencional para *S. aureus*
50

Tabla N° 4. Presentación de resultados de PCR convencional para *S. epidermidis*
51

RESUMEN

Los derivados del péptido LL-37, una catelicidina del sistema inmune han sido ampliamente estudiados por sus efectos antimicrobianos; en el presente estudio se evalúa el efecto antibiopelícula de sus derivados LL37-1 y DLL-37 diseñados por el grupo de investigación REMA sobre la expresión de algunas proteínas del sistema de Quorum sensing, para ello se evaluó la presencia de algunos genes de complejo agr, se tipificó el AIP por medio de PCR convencional y se realizó un análisis de expresión relativa de los genes del sistema por medio de PCR en tiempo real para aislamientos clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis* productores de biopelícula.

En cada una de las cepas se encontró al menos uno de los genes del complejo, con lo cual se pudo evidenciar la presencia del sistema en todas las cepas estudiadas, en cuanto al efecto de los péptidos sobre su expresión se observan diferentes efectos individuales para cada una de las cepas que las cepas de *S. aureus* tienen una disminución de la expresión del gen *agrA* a las 8 y 10 horas con el péptido LL-37 y las cepas de *S. epidermidis* a la 10 horas con el péptido DLL-37 para el gen *agrB*.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de los péptidos LL-37 sobre la expresión del Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Específicos

1. Determinar mediante herramientas de bioinformática los primers para los genes *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* que intervienen en el proceso de Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.
2. Identificar los genes del operon *agr* y los autoinductores que intervienen en el proceso de Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.
3. Medir el nivel de expresión de los genes *agr* involucradas en el proceso de comunicación bacteriana Quorum sensing en diferentes cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en ausencia y presencia de los péptidos LL-37.

INTRODUCCIÓN

Los reportes epidemiológicos en el 2006 de la revista *Emerging Infectious* del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), los *Staphylococcus* spp fueron reportados como patógenos adquiridos en la comunidad y causantes de infecciones nosocomiales, también mencionó, el primer casos en Colombia de celulitis y fascitis necrotizante causado por *S.aureus* adquirido en la comunidad (1). En 2014 el CDC publicó el resumen datos reportados sobre patógenos con resistencias a antimicrobianos asociados con infecciones en servicios de salud donde los *S. aureus* presento una resistencia el 11.8% de las cepas estudiadas y los *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) (7.7%). (1)

En Inglaterra en el año 2012, el segundo patógeno más frecuente aislado procedimientos quirúrgicos fue *S. aureus* (24%) de los cuales el 18% mostró resistencia a la Meticilina, y los SCN se encontraron asociados a implantes (2). Según el sistema de reporte del National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), durante el 2003, el 59.5% de los *S. aureus* y el 89.1% de los SCN procedentes de infección en pacientes de Unidad de Cuidados Intensivos son resistentes a la meticilina (3).

Para Colombia según los informes publicados Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO), en el año 2016 *S. aureus* fue el responsable del 5 al 10% de las infecciones en pacientes hospitalizados y de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) adultos y del 5 al 15% de UCI pediátrica y neonatal con un aumento de resistencia a la Meticilina. Con respecto a *S. epidermidis*, este representa del 5 al 10% de los responsables de infección en hospitalización y UCI adultos y pediátrica. Para la UCI neonatal, *S. epidermidis* es el patógeno más frecuentemente aislado (20- 25%) (4)

Antes de que la era de los antibióticos comenzara, el pronóstico de los pacientes con infecciones estafilocócicas severas se consideraba de pronóstico reservado; sin embargo el descubrimiento de la penicilina en 1940 reverso drásticamente esta situación (6), pero con el uso indiscriminado de los antibióticos la resistencia a los antimicrobianos vuelve a ser desfavorecedor, para el tratamiento de las infecciones. (5)

Esto ha llevado a diferentes investigadores a dirigir sus estudios en el diseño o búsqueda de agentes bactericidas/ bacteriostáticos o el uso de terapias alternativas para atenuar la patogenicidad y así lograr la resolución a infecciones causadas por diferentes especies de este género bacteriano como es el caso de los péptidos antimicrobianos derivados de la catelicidina humana LL37 (5-7)

MARCO TEORICO

1. ***Staphylococcus sp.***

Los *Staphylococcus spp.* causan diferentes enfermedades en los seres humanos siendo los más frecuentemente aislados *S. aureus* y *S. epidermidis* debido a que ellos tienen la capacidad de colonización y adhesión en piel, hueso, tejidos blandos, pulmón, riñón, corazón, entre otros, lo que permite ser clasificados como microorganismos patógenos (8).

a. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria comensal que se encuentra aproximadamente en el 30% de la población humana, ha sido considerado el principal patógeno que causa infecciones nosocomiales en las unidades de cuidados intensivos mediante la evasión del sistema inmune al bloquear la quimotaxis de leucocitos, secuestrando los anticuerpos del huésped, escapando de la detección por medio del polisacárido capsular (9).

b. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis es la especie bacteriana más prevalente de los *Staphylococcus* coagulasa negativa, ha sido reconocido como un importante reservorio de genes de resistencia que por medio de transferencia horizontal aumentan la patogenicidad de *S. aureus*, se encuentra en piel y mucosas humanas, en los últimos años se ha reportado como un importante patógeno nosocomial, particularmente en pacientes inmunocomprometidos principalmente en neonatos (10).

Estas bacterias tienen una gran variedad de estrategias para sobrevivir cuando son sometidas a estrés, mediante la disminución o inactivación de su crecimiento cambia las principales funciones celulares como es su metabolismo, con el fin de prevenir el daño celular y su supervivencia y como todo ser vivo se organiza espontáneamente dentro de un complejo sobre diferentes escalas de longitud, para lo cual requiere comunicación mediante un amplio rango de comportamiento social, incluyendo la cooperación de las células o colonias bacterianas de un grupo individual, dependiendo de la

densidad celular pues en bajas concentraciones promueve la unión y colonización, mientras que a altas densidad la bacteria inicia un proceso de secreción de toxinas y proteasas presumiblemente para la diseminación bacteriana, mediante una señalización interna química que se va incrementando y acumulándose a medida que la densidad poblacional aumenta a esto se le denomina quorum sensing (QS) (11)

2. **Quorum sensing (QS)**

Este sistema de QS es controlado cuando la comunidad bacteriana llega a la máxima intensidad o concentración de señalización e interactúa con una proteína receptora, causando un cambio coordinado en la expresión del gen en la población. Muchos tipos de señalización existen, las bacterias Gram negativas utilizan la acil homoserina lactona y las bacterias Gram positivas emplean oligopéptidos cortos comúnmente llamadas feromonas, que contienen un compuesto anhídrido cíclico que es requerido para la actividad y prevenir la dimerización por formación de puentes disulfuro (11).

Estos oligopéptidos de secreción son autoinductores (AI) del QS, usa dos sensores de quinasa para la detección de señales peptídicas que favorece la comunicación célula-célula mediante fosforilación y la unión al DNA y de esta manera regula la transcripción de genes, que como consecuencia afecta el comportamiento de la bacteria, modifica los péptidos cíclicos, estos AI es un sistema para que las bacterias patógenas, lo utilicen como una molécula señal para favorecer la colonización en el huésped. (12)

El AI-1 presenta dos funciones una es la de difundirse a través la célula y liberarse en el ambiente, la otra función la realiza simultáneamente y es favorecer el crecimiento concentración bacteriana (13)

El AI-2 se encuentra unido al espacio periplásmico, se considera un gen regulatorio que se une a moléculas señales específicas, se incrementa en la fase exponencial, en *S. aureus* y *S. epidermidis* regula la secreción de los factores asociados a la virulencia, alteran las modulinas solubles en fenol

reconocidas como un factor importante en los procesos inflamatorios y evasión del sistema inmune (13)

El péptido autoinductor (PAI) cumple las funciones de autoinductor como molécula señal a través de un ligando extracelular que actúa como un sensor en la densidad de la población, alcanza su máxima expresión en la fase logarítmica tardía y en la fase estacionaria en bacterias, en este sistema el QS es codificado por el gen *agr*, el cual es un péptido cíclico con actividad auto catalítica que mediante señales polipeptídicas, regula la expresión de diversas proteínas de superficie celular, exotoxinas, factores de virulencia y otros genes accesorios a través de un modelo de señalización clásica de auto-activación (14,15)

El locus *agr* comprende genes *agrA*, *agrB*, *agrC*, y *agrD* cada uno con características especiales tales como:

a. *AgrA*

Induce la transcripción de P2 y P3; P2 induce la producción RNAII, es un transcrito es policistrónico que tiene actividad autocatalítica, y P3 inicia su producción mediante el transcrito RNAIII sus funciones es la transducción de proteínas de señal, codifican para una variedad de exoproterinas de superficie celular que van a favorecer la colonización bacteriana tales como proteína A, las proteínas de unión al fibrinógeno y activa la expresión de genes para la secreción de exotoxinas y enzimas que degradan tejido (16)

Otra de las funciones de RNAIII es favorecer la colonización e invasión en la infección *Staphylococcus*, así como la expresión de varios factores de virulencia tales como la alfa-Toxina, beta-Toxina y d-Toxina, la serin proteasa, DNasa, fibrinolisisina, enterotoxina, la toxina del síndrome de shock tóxico (SST-1); en *S. aureus* por su parte, en *S. epidermidis* es el responsable de la regulación de la expresión de proteasas, d-toxina, lipasa y exopolisacarido (17).

b. *AgrB*

Es un péptido activador consta de una proteína con seis segmentos transmembranal de los cuales 4 son α hélices y dos presentan regiones altamente hidrofílicas, se encuentra localizado en la membrana citoplasmática, donde induce su propia sobreexpresión, se considera que es responsable de la modificación post transcripcional en los *Staphylococcus*, por la liberación de la thiolactona, reacción que ocurre durante la maduración de la feromona. Su secuencia varía de acuerdo a la especie de *Staphylococcus* y son divergente excepto en la región N- terminal localizada en el citoplasma (18).

c. AgrC

Es una proteína de membrana, el extremo carboxiterminal contiene muchos motivos de histidina quinasa altamente conservado se encuentra localizado dentro del citoplasma, el N-terminal presenta un sensor de dominio integrada dentro de la membrana citoplasmática para facilitar la unión al ATP, que va a permitir activar los componentes internos de la vía de señalización, mediado por el receptor oligomérico y la unión al ligando responsables de la oligomerización. AgrC varía en las diferentes especies de *Staphylococcus* por la divergencia presentada en su N-terminal (19).

Para la activación de AgrC se requiere la presencia de un grupo de autoinductores que puede ser inhibido por un grupo heterólogo de los mismos AIP`s. Basado sobre la activación e inhibición cruzada de los AIP, se puede diferenciar cuatro grupos específicos de AIP`s en *S. aureus* y tres grupos en *S. epidermidis* (20).

d. agrD,

Contiene 28 residuos de cisteínas altamente conservados, la secuencia de aminoácidos varía de acuerdo a la especie de *Staphylococcus*, pero 4 de estos son comunes para todas las especies, se encuentra anclado en el lado interno de la membrana citoplasmática, formando una α - hélice anfipática en su N-terminal permitiendo la formación de un anillo de thiolactona, cataliza el intercambio de tioester y favorece la autoinducción del péptido autoinductor maduro que está conformado de 7-9 aminoácidos

en longitud de acuerdo a la especie en *Staphylococcus* y todos contiene una molécula de tiolactona conformado por 5 aminoácidos, unidos en forma de anillo a un tioester formado entre un grupo sulfhidrilo de residuo de cisteínas conservadas en el grupo carboxilo terminal excepto en *S. intermedius* (21,22)

Teniendo en cuenta que el QS controla la expresión de factores de virulencia mediante el sistema de *agr* se requiere el desarrollo de nuevas terapéuticas como son los péptidos antimicrobianos dentro de los que se encuentra las catelicidina humana denominados LL-37 por los 37 aminoácidos de longitud, su estructura es una α - helicoidal (23)

3. **Péptido LL-37**

El péptido LL-37 se almacena en los gránulos de los neutrófilos en forma de pro péptidos, se encuentra células epiteliales ubicadas en el tracto gastrointestinal y genitourinario, árbol bronquial y en la piel presenta la capacidad de prevenir infecciones bacterianas especialmente por su actividad antimicrobiana, antibiopelícula y anti Quorum Sensing (24).

El grupo de investigación REMA en colaboración con la Universidad Nacional de Colombia ha diseñado péptidos derivados de la catelicidina humana, los cuales conservan las características del mismo; buscando mejorar los efectos del péptido original. Entre ellos se encuentran el péptido LL37-1 y el DLL37 de 24 y 25 aminoácidos respectivamente que presentan mayor score antimicrobiano por bioinformática.

Se ha demostrado que el enantiómero DLL-37 tiene una actividad biológica más larga y no puede ser hidrolizado por las enzimas catalíticas. Es por esta razón que se realizó la identificación de los genes *agrA* y *agrB* involucrados en el formación del QS y determinar la expresión con los péptidos anteriormente mencionados (25).

METODOLOGÍA

Se utilizaron 19 cepas de *S. aureus* y 17 cepas de *S. epidermidis* procedentes de aislamientos clínicos (Sepsis, Infecciones de piel, infecciones asociadas a catéter, entre otras), y 3 cepas ATCC (*S. aureus* USA 300 y *S. epidermidis* 35984 y 12228), que se encontraban criopreservados a -80°C en el cepario del grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, de las cuales, la totalidad de los aislamientos de *S. aureus* fueron proporcionadas por el laboratorio de genética molecular bacteriana de la Universidad del Bosque. La nomenclatura y origen de las cepas se muestran en el Anexo N° 1.

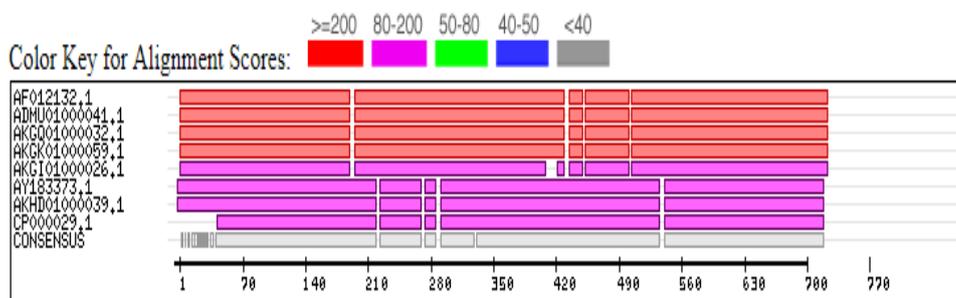
A las cepas seleccionadas para este estudio, previamente se les realizó confirmación por biología molecular de género y especie (Anexo N° 2), curvas de crecimiento con y sin péptidos LL-37, pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos y la detección de los genes del operon *Ica* ADBC y su gen regulador *IcaR*. En el Anexo N°1 se presentan los nombres de las cepas asignadas y la infección asociada a su aislamiento (Si esta es conocida) y estos fueron claves como criterios de exclusión para este estudio.

1. Determinar mediante herramientas de bioinformática los primers para los genes *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* que intervienen en el proceso de Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

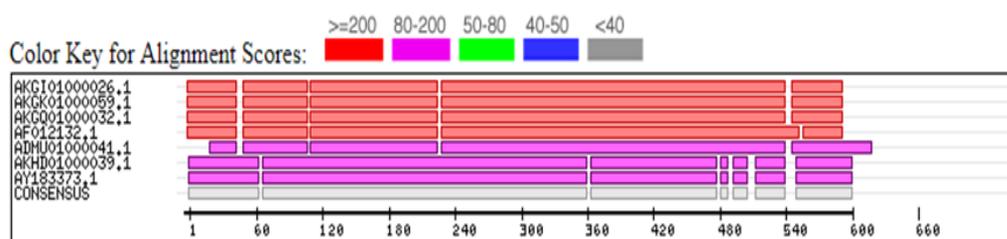
Para el diseño de los primers se llevó a cabo de la siguiente manera

- a. **Definir las secuencias consenso de cada uno de los genes mencionados anteriormente:** para esta identificación inicialmente se tomaron las secuencias reportadas en la base de datos de genes y genomas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine de cada uno de los genes *agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD* a estudiar, luego fueron sometidas a alineamiento con la herramienta bioinformática de multALIN (Gráficas 1 y 2) la secuencia consenso de cada uno de los genes del operon *agr* fueron analizadas en el programa bioinformático Primer3Plus para el diseño de los primers (Gráficas 3 y 4).

Grafica N° 1. Alineamiento de secuencias de *agrA* de *S. epidermidis*



Grafica N° 2. Alineamiento de secuencias de *agrB* de *S. epidermidis*



Grafica N° 3. Selección de primers para *agrA* de *S. epidermidis*

Pair 2:

Left Primer 2: Primer_1_F
 Sequence: TGAGTCGTGTATGCTGTTTC
 Start: 324 Length: 22 bp Tm: 58.9 °C GC: 45.5 % ANY: 3.0 SELF: 0.0

Right Primer 2: Primer_1_R
 Sequence: GCCAGTGAATTCGTAACATGA
 Start: 504 Length: 23 bp Tm: 61.2 °C GC: 39.1 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Product Size: 181 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0

Grafica N° 4. Selección de primers para *agrB* de *S. epidermidis*

Pair 2:

Left Primer 2: Primer_1_F
 Sequence: CGGTACACATGCAAATTCGT
 Start: 222 Length: 20 bp Tm: 59.5 °C GC: 45.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0

Right Primer 2: Primer_1_R
 Sequence: TGCAGGTGCGTATAAAATCG
 Start: 378 Length: 20 bp Tm: 59.7 °C GC: 45.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0

Product Size: 157 bp Pair Any: 6.0 Pair End: 1.0

- b. **Comprobar de la especificidad de los primers:** para comprobar la especificidad, la homología y el mejor score de los alineamientos de cada uno de los primers obtenidos anteriormente mencionados para *S.*

epidermidis, se realizó en la base de datos Nucleotide BLAST® de NCBI (Gráficas 5- 8), y con el programa OlygoAnalyzer®. Posteriormente se determinó la formación de estructuras secundarias para finalmente obtener las secuencias de los primers que se muestran en la Tabla No. 1.

Grafica N° 5. Resultados del BLAST para el primer R de agrA *S. epidermidis*

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain CSF41498 chromosome complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP030246.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain GT112 chromosome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP028282.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_161 chromosome complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP014132.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_153 chromosome complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP014119.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain DAR1907 chromosome complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP013943.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SE95 chromosome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP024437.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SE90 chromosome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP024408.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain ATCC_12228 complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP022247.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 1457 chromosome complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP020463.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 14.1 R1 chromosome complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP018842.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis isolate BPH0662 genome assembly chromosome_1	40.1	40.1	100%	0.32	100%	LT571449.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 949_S8 genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP010942.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SE1 complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP009046.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis PM221 complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	HGB13242.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 1457 RNAIII delta hemolysin (hly) accessory gene regulator protein B (agrB) accessory gene regulator protein D (agrD) accessory gene	40.1	40.1	100%	0.32	100%	FJ707317.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain O47 delta toxin (hly) AgrB (agrB) AgrD (agrD) truncated AgrC (agrC) and AgrA (agrA) genes complete cds	40.1	40.1	100%	0.32	100%	AY183373.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SR1 clone stev_1047a09 genomic sequence	40.1	40.1	100%	0.32	100%	AF270070.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SR1 clone stev_1039411 genomic sequence	40.1	40.1	100%	0.32	100%	
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis hly and agrA,B,C,D genes	40.1	40.1	100%	0.32	100%	

Questions/comm

Grafica N° 6. Resultados del BLAST para el primer F de agrA *S. epidermidis*

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain CSF41498 chromosome complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP030246.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain GT112 chromosome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP028282.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_153 chromosome complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP014119.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 1457 chromosome complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP020463.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 949_S8 genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP010942.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SE1 complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP009046.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis PM221 complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	HGB13242.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 1457 RNAIII delta hemolysin (hly) accessory gene regulator protein B (agrB) accessory gene regulator protein D (agrD) accessory gene	46.1	46.1	100%	0.008	100%	FJ707317.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SR1 clone stev_1047a09 genomic sequence	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AF270070.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SR1 clone stev_1039411 genomic sequence	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AF269927.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis RP62A complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	CP000020.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis ATCC_12228 complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AF015929.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis agr system including response regulator (agrA) histidine kinase (agrC) AgrD (agrD) AgrB (agrB) and delta toxin (hly) genes complete cds	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AF012132.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sacrochryticus isolate Staphylococcus sacrochryticus 883 genome assembly chromosome_1	40.1	40.1	86%	0.48	100%	LT953438.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sacrochryticus strain FDAARGOS_355 chromosome complete genome	40.1	40.1	86%	0.48	100%	CP022093.2
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sacrochryticus strain FDAARGOS_336 chromosome complete genome	40.1	40.1	86%	0.48	100%	CP022056.2
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sacrochryticus strain FDAARGOS_168 chromosome complete genome	40.1	40.1	86%	0.48	100%	CP014113.2
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sacrochryticus strain FDAARGOS_137 complete genome	40.1	40.1	86%	0.48	100%	

Questions/comm

Grafica N° 7. Resultados del BLAST para el primer R de agrB *S. epidermidis*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_161 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP914132.1
Staphylococcus epidermidis strain DAR1907 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP913843.1
Staphylococcus epidermidis isolate EP19962 genome assembly, chromosome_1	40.1	40.1	100%	0.32	100%	LT571449.1
Staphylococcus epidermidis strain C4T delta toxin (hfl, AgrB, agrB), AgrD, agrD, truncated AgrC, agrC, and AgrA, agrA) genes, complete set	40.1	40.1	100%	0.32	100%	AY183373.1
Staphylococcus epidermidis hfl and agrA, B, C, D) genes	40.1	40.1	100%	0.32	100%	Z49220.1
Staphylococcus epidermidis strain CSF41498 chromosome, complete genome	36.2	36.2	90%	5.0	100%	CP910246.1
Staphylococcus epidermidis FP524, complete genome	36.2	36.2	90%	5.0	100%	CP900029.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, complete genome	36.2	36.2	90%	5.0	100%	AE915929.1
Staphylococcus epidermidis agr system including response regulator (agrA), histidine kinase (agrC), AgrD, agrD, AgrB, agrB) and delta toxin (hfl) genes, complete set	36.2	36.2	90%	5.0	100%	AF912132.1
Favobacterium sp. MEB03720 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	20	100%	CP929493.1
Sphingobacterium sp. G1-14, complete genome	34.2	34.2	85%	20	100%	CP921381.1
Konopsea bacter naticola strain R2301, complete genome	34.2	34.2	85%	20	100%	CP919875.1
Konopsea bacter rhadocus strain GEM genome assembly, plasmid_2	34.2	34.2	85%	20	100%	LT575484.1
Anaerobaculum sp. XH2, complete genome	34.2	34.2	85%	20	100%	CP914140.1
Ovis canadensis canadensis isolate 43U chromosome 11 sequence	34.2	64.4	85%	20	100%	CP910896.1
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_14	32.2	62.4	95%	78	100%	LS992080.1
PREDICTED: Theropithecus oedae uncharacterized LOC112859861 LOC112859866, mRNA	32.2	32.2	80%	78	100%	XM_025355792.1
PREDICTED: Phobocetus senesis Fc1 GTPase activating protein non-catalytic beta subunit (F6A_GAFB), mRNA	32.2	32.2	80%	78	100%	XM_025195310.1
Favobacterium sp. HY00049 chromosome, complete genome	32.2	32.2	80%	78	100%	CP929811.1
Flavobacterium sensu lato NIES-204 DNA, complete genome	32.2	32.2	80%	78	100%	

Grafica N° 8. Resultados del BLAST para el primer F de agrB *S. epidermidis*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_161 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP914132.1
Staphylococcus epidermidis strain DAR1907 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP913843.1
Staphylococcus epidermidis isolate EP19962 genome assembly, chromosome_1	40.1	40.1	100%	0.32	100%	LT571449.1
Staphylococcus epidermidis strain C4T delta toxin (hfl, AgrB, agrB), AgrD, agrD, truncated AgrC, agrC, and AgrA, agrA) genes, complete set	40.1	40.1	100%	0.32	100%	AY183373.1
Staphylococcus epidermidis hfl and agrA, B, C, D) genes	40.1	40.1	100%	0.32	100%	Z49220.1
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_30	36.2	132	90%	5.0	100%	LS992191.1
PREDICTED: Brucella abortus isolate vaxme family 18 member 12 (LOC116412), truncated variant X2, mRNA	36.2	36.2	90%	5.0	100%	XM_016127998.1
PREDICTED: Phalaena vitellina coiled coil and C2 domain-containing protein 2a-like LOC105292291, mRNA	36.2	36.2	90%	5.0	100%	XM_01550999.1
Deorsetia entomocarpae genome assembly, S. entomocarpae, scaffold SPER_cont0174227	36.2	36.2	90%	5.0	100%	LN623721.1
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_78	34.2	219	90%	20	100%	LS992069.1
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_58	34.2	223	90%	20	100%	LS992061.1
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_35	34.2	257	85%	20	100%	LS992094.1
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_18	34.2	159	85%	20	100%	LS992081.1
PREDICTED: Galius villosus uncharacterized LOC10761962 LOC107619621, mRNA	34.2	34.2	85%	20	100%	XM_001463262.1
Deorsetia entomocarpae genome assembly, S. entomocarpae, scaffold SPER_cont0090349	34.2	34.2	85%	20	100%	LN605641.1
PREDICTED: Chironia mydas elongin homolog domain-containing family F with FYVE domain member 2 (PLE34F2), mRNA	34.2	34.2	85%	20	100%	XM_007050888.1
Bacillus thuringiensis MC21 element dMCT33, complete sequence	34.2	34.2	85%	20	100%	CP930369.1
Campylobacter bronnenbroethalensis CB017461 (CB017461) mRNA, complete set	34.2	34.2	85%	20	100%	XM_007941996.1
Pedicularis furcata, coronata delta-aminolevulinic acid dehydratase, partial, mRNA	34.2	34.2	85%	20	100%	XM_00455980.1
Homo sapiens chromosome 1 clone RP11-330C7, complete sequence	34.2	34.2	85%	20	100%	AC104322.2
Musca DNA sequence from clone RP23-198C17 on chromosome 7, complete sequence	34.2	34.2	85%	20	100%	
Triticum aestivum genome assembly, chromosome_30	34.2	124	85%	20	100%	

Es importante anotar que los primers *agrA*, *agrB*, y *agrC* para los *S. aureus* fueron diseñados anteriormente en el grupo de investigación REMA utilizando las mismas herramientas bioinformáticas descritas.

c. Diferenciar los genes autoinductores para QS en las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*: La identificación de las moléculas señal del sistema agr, para *S. aureus*, se evaluó la presencia de los autoinductores tipo I, II, III, IV y I, II, III y en *S. epidermidis* usando los primers y protocolo reportados por Shahin Najar Peerayeh et al. en el

año 2009 (26) y Li et al., en el año 2004 (27) respectivamente, es importante anotar que a estas secuencias se les realizó una análisis bioinformático con los programa BLAST®, y OlygoAnalyzer®.

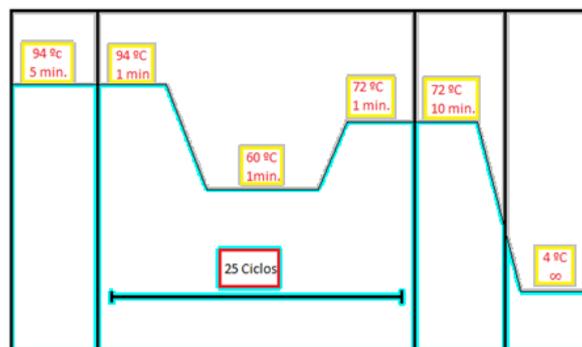
2. Identificar los genes del operon agr y los autoinductores que intervienen en el proceso de Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

a. Extracción de ADN de los aislamientos de *S. aureus* y *S. epidermidis*:

Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante mediante el kit (promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual) y posteriormente se cuantifico el ADN obtenido en NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers para verificar su concentración y pureza. Ver Anexo II

b. Amplificación de los genes en estudio: La amplificación de todos los genes se realizó utilizando el protocolo de amplificación que se muestra en la Gráfica N° 9 y MasterMix: Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 3Mm, dNTP's 0,2Mm, primers R/F 0,5Um/L, Taq polimerasa 0,25 U/uL

Grafica N° 9. Protocolo de amplificación para detección de genes por medio de PCR convencional



c. Visualización de los productos de amplificación: se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.8% con buffer de corrido al 1X (0.9 M Tris-Borato, 0.002 M EDTA pH 8.0). Se sembraron 5ul de cada amplicón y 3ul de PPM (HyperLadder IV) en el gel y se corrió a un

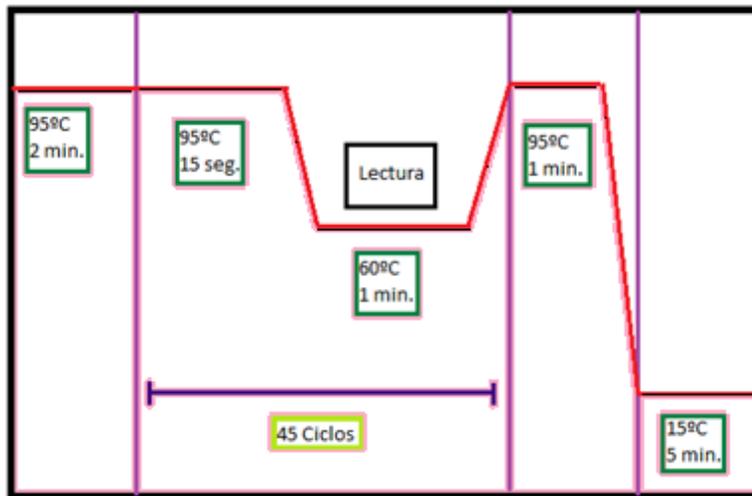
voltaje de 80V por 50 minutos. La tinción del gel se hizo con GelRed Nucleic Acid Stain 10000X in water de la casa comercial Biotium y se observaron en el transiluminador marca BIORAD Universal Hood II.

3. Medir la expresión de los genes *agr* involucradas en el Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en ausencia y presencia de los péptidos LL-37 y DLL-37

Los primers requeridos para la PCR en tiempo real fueron los mismos para los genes *agrA* y *agrB*, que se emplearon en la PCR convencional, como genes House keeping para *S. aureus* se usó Gyr-B y para *S. epidermidis* 16SRNA ribosomal. Para la PCR en tiempo real se tuvo en cuenta que las 2 cepas en estudio (Co81 y 22-6) y las tres cepas ATCC presentaran el operon QS, para luego ser sometidos a el efecto de los péptidos LL- 37 y DLL-37 a un concentración final de 5 μ M durante 8; 10 y 12 horas.

- a. Extracción de ARN:** Se realizó por el método de Chomsisky (28) agregando un tratamiento previo con proteinasa K a una concentración final de 25U/mL y lisozima/lisostafina. a una concentración 25mg/2mg/mL e incubación a 37°C por 1 hora.
- b. Síntesis del cDNA:** Se siguieron los protocolos del kit Transcriptasa Reversa Improm-II™ de Promega.
- c. Cuantificación de los ácidos nucleicos** se llevaron a cabo en el equipo Nanodrop Tecnocientific 2000.
- d. Expresión de los genes:** la PCR en tiempo real para el análisis de expresión se realizó en el equipo BioRad CFX96 Touch™ Real Time PCR System en el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud Distrital de Bogotá, utilizando el kit GoTaq qPCR Master Mix de Promega de acuerdo a las indicaciones del fabricante y usando el protocolo de amplificación que se muestra en la Gráfica N° 10, conservando la misma concentración de la PCR convencional y la lectura se analizó por medio de su software.

Grafica N° 10. Protocolo de amplificación para detección de genes por medio de PCR en tiempo real



- e. Análisis estadístico:** los datos se normalizaron usando el modelo matemático para PCR en tiempo real propuesto por Pfaffl y colaboradores en el año 2001(29). El análisis de estos datos se realizó mediante el programa GraphPad PRISM, utilizando el test de ANOVA-1 vía junto con el test de Bonferroni.

RESULTADOS

En la Tabla N° 1 se presentan los primers utilizados en el estudio, tanto los diseñados por el grupo de investigación como los consultados en la literatura para PCR convencional y en tiempo real.

Tabla N° 1. Primers para los genes *agrA* y *agrB* de *S. epidermidis*

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto	T° melting	Fuente
AGREA-R	CGAAACAATTTTCGCCATTC	181 pb	60°C	Grupo de investigación REMA
AGREA-F	CTCATTGCACATCTTGATAATCG			
AGREB-R	TGCAGGTGCGTATAAAATCG	157 pb		
AGREB-F	CGGTACACATGCAAATTCGT			
AGRA- R	TGTTACCAACTGGGTCATGC	150 pb		
AGR-A-F	CCCTCGCAACTGATAATCCT			
AGRB-R	GTGCACCATGTGCATGTCTTC	205 pb		
AGRB-F	GACCAGTTTGCCACGTATCTTC			
AGRC-R	AGACCTAAACCACGACCTTCAC	147 pb		
AGRC-F	TGACCCTATCATTGCGGTTG			
SAI-R	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	440 pb	58°C	Shahin Najar Peerayeh <i>et al.</i> (2009)
SAII-R	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572 pb		
SAIII-R	CTGTTGAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406 pb		
SAIV-R	CGATAATGCCGTAATACCCG	588 pb		
SA-F	ATGCACATGGTGCACATGC	-		
SEAI-R	GCTGCAACCAAGAAACAACC	1022pb	60°C	Li <i>et al.</i> (2004)
SEAI-F	CGTGTATTCATAATATGCTTCGATT	453pb		
SEAI-R	TATGCAAGCCAAGCACTTGT			
SEAI-F	GTGCGAAAGCCGATAACAAT	615pb		
SEAI-R	CCTTGGCTAGTACTACACCTTC			
SEAI-F	GTGCTTGGCTTGCATAAACA			
16SRNA-R	CTAGAGGGGTCAGAGGATGTCA	285pb	60°C	Grupo de investigación REMA
16SRNA-F	GGCGACTTTCTGGTCTGTAAC			
GYRB- R	CGGCATCAGTCATAATGACGAT			

GYRB-F	CAAATGATCACAGCATTGGGTACAG	91 pb		
--------	---------------------------	-------	--	--

Para los genes *agrC* de *S. aureus* y *agrD* de ambas especies, los primers diseñados no eran específicos debido a la longitud de uno de los genes y a la escases de secuencias adecuadas para elaborarlos; sin embargo se evalúa un componente del Cassete de QS (*agrBD*) y uno del sistema de dos componentes (*agrAC*) que además, se expresan como un transcrito por cada pareja de genes.

En las gráficas 11- 13 se presentan las fotografías de los geles para los genes *agrA* y *agrB* y *agrC* de *S. aureus* en los cuales se emplearon los primers AGRA, AGRB y AGRC respectivamente En las gráficas 14 y 15 se observan los fragmentos amplificados para los genes *agrA* y *agrB* en las cepas de *S. epidermidis* en los cuales se emplearon los primers AGREA y AGREB.

Gráfica N° 11. Detección electroforética del gen *agrA* en cepas de *S. aureus*



Gráfica N° 12. Detección electroforética del gen *agrB* en cepas de *S. aureus*



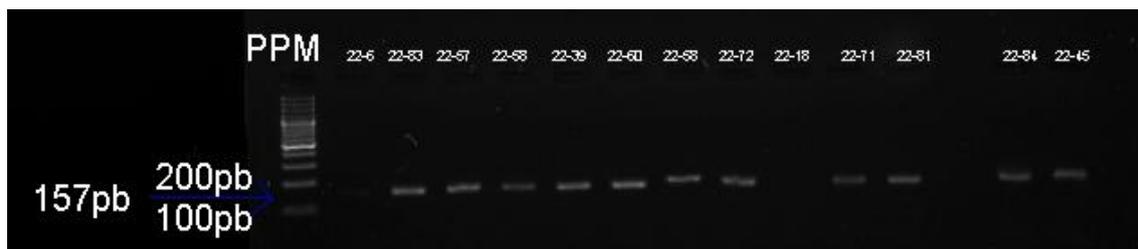
Gráfica N° 13. Detección electroforética del gen *agrC* en cepas de *S. aureus*



Gráfica 14. Evaluación de la presencia del gen *AgrA* en cepas de *S. epidermidis*



Gráfica 15. Evaluación de la presencia del gen *AgrB* en cepas de *S. epidermidis*

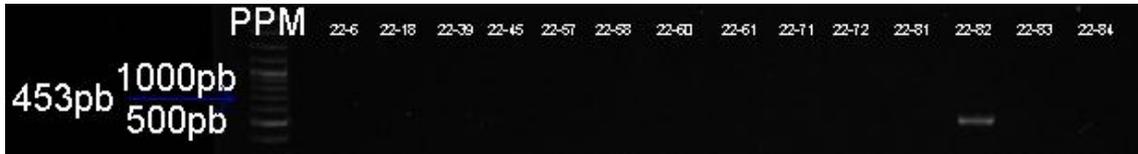


Para la tipificación de los Péptidos Autoinductores se realizaron PCR individual para cada uno de los AIP`s en *S. epidermidis* (Gráficas 16 y 17) con los primers SEAI, SEAII y SEAIII y PCR dúplex para *S. aureus* (Gráficas 18 y 19) empleando los primers SAI, SAII, SAIII, SAIV, y SA.

Gráfica N° 16. Electroforesis de productos de PCR para detección de AIP tipo I en *S. epidermidis*



Gráfica N° 17. Electroforesis de productos de PCR para detección de AIP tipo II en *S. epidermidis*



Gráfica N° 18. Tipificación de los AIP`s I y II de *S. aureus*



Gráfica N° 19. Tipificación de los AIP`s III y IV de *S. aureus*



Los resultados de las PCR`s convencionales se presentan de manera detallada en el Anexo N° 3. En las Tablas 2 y 3 se presenta de manera resumida la distribución general de los genes estudiados.

Tabla N° 2. Presencia de los genes *agrA* *agrB* y *agrC* en los aislamientos clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Gen Cepa	<i>agrA</i>	<i>agrB</i>	<i>agrC</i>
<i>S. aureus</i>	100% (19)	57,9% (12)	100% (19)

<i>S. epidermidis</i>	100% (17)	76,4% (13)	NA
NA	No aplica		

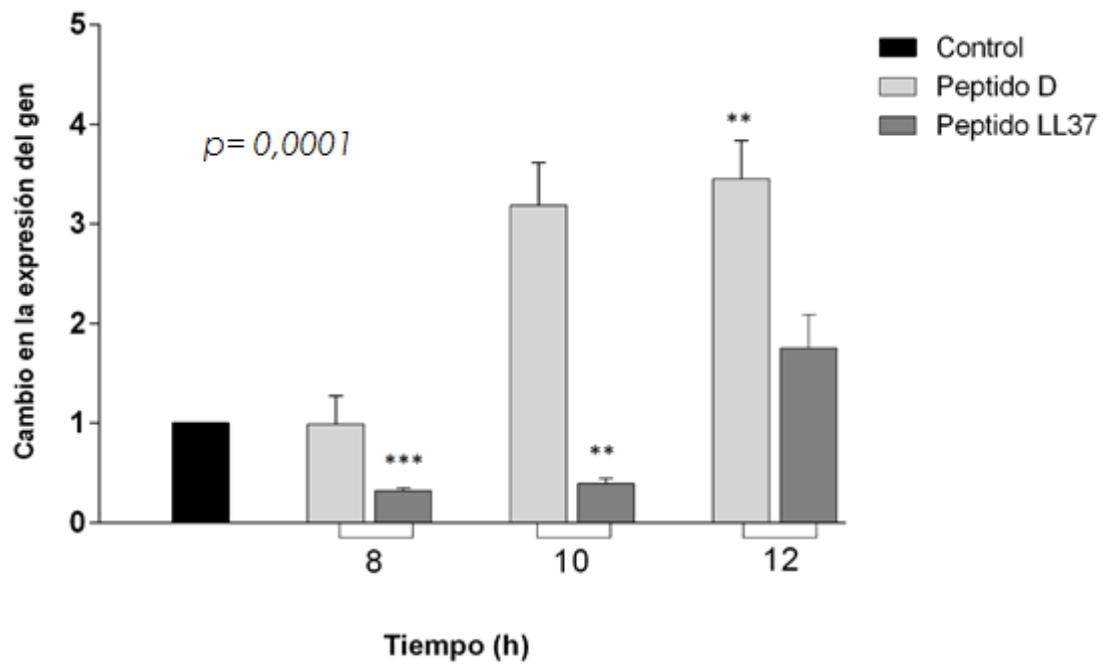
Tabla N° 3. Tipificación de los AIP's de las cepas estudiadas

Especia bacteriana	AIP I	AIP II	AIP III	AIP IV	SA*
<i>S. aureus</i>	42.1% (8)	31.5% (7)	10.5% (2)	0%	10.52% (2)
<i>S. epidermidis</i>	94.10% (16)	5.80% (1)	0%	NA	0%

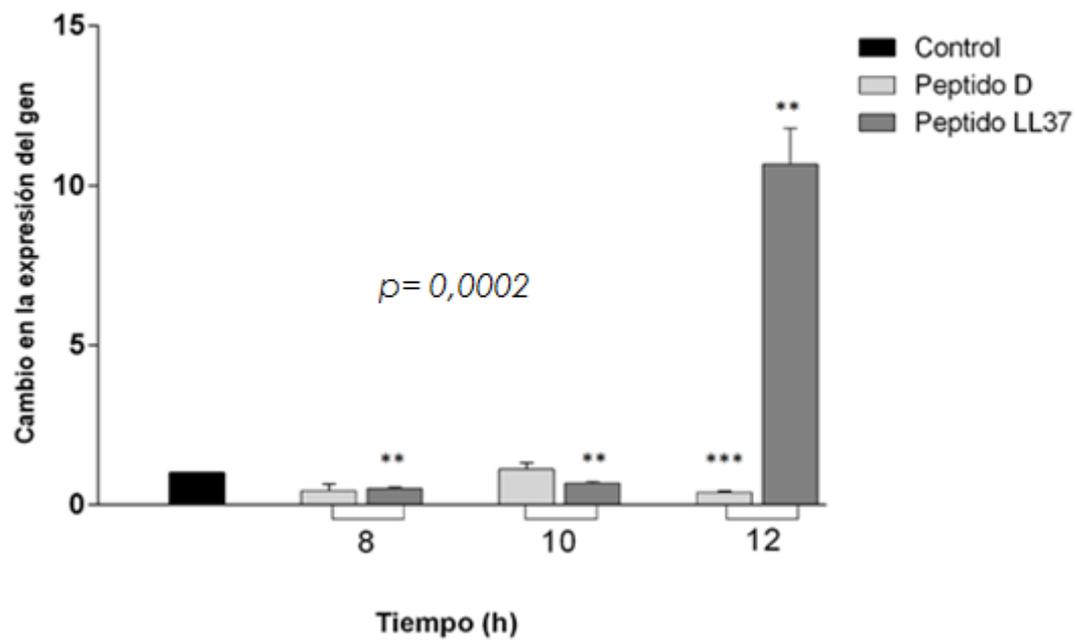
* Sin amplificación
NA No aplica

En cuanto al análisis de expresión relativa se seleccionaron las cepas COL81 y 22-6, las cuales no mostraron resultados significativos en los análisis de producción de biopelícula y en las gráficas 20- 29 se presentan los datos normalizados y en la Tabla N° 4 se presentan los porcentajes de aumento o disminución en la expresión de los genes *agrA* y *agrB*.

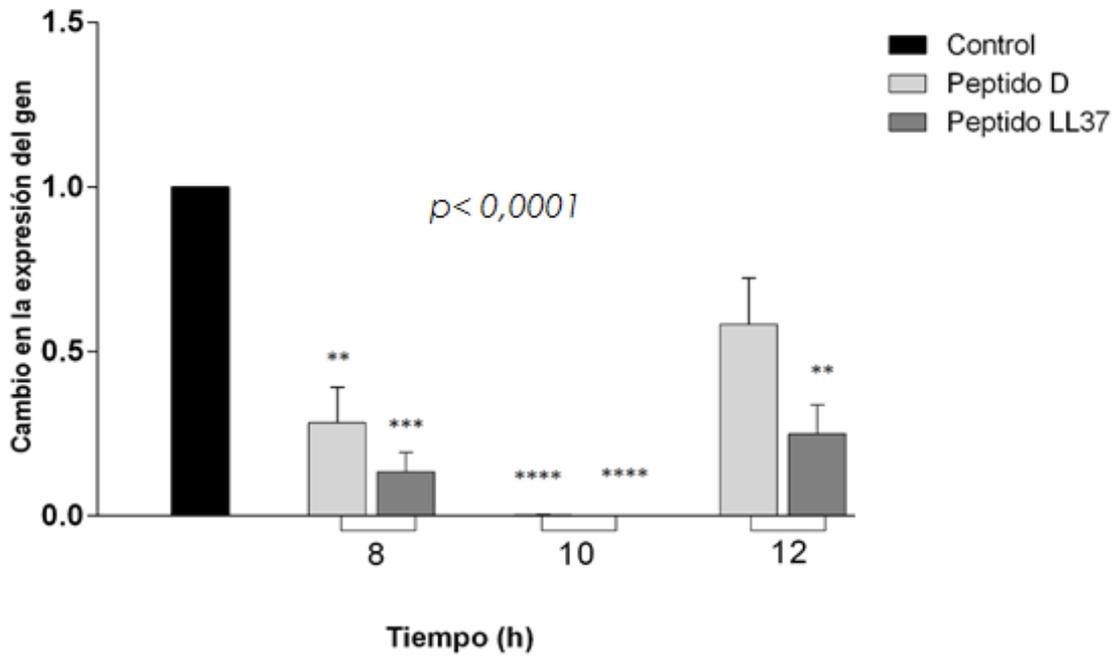
Gráfica N° 20. Análisis de expresión del gen *agrA* en la cepa ATCC USA300



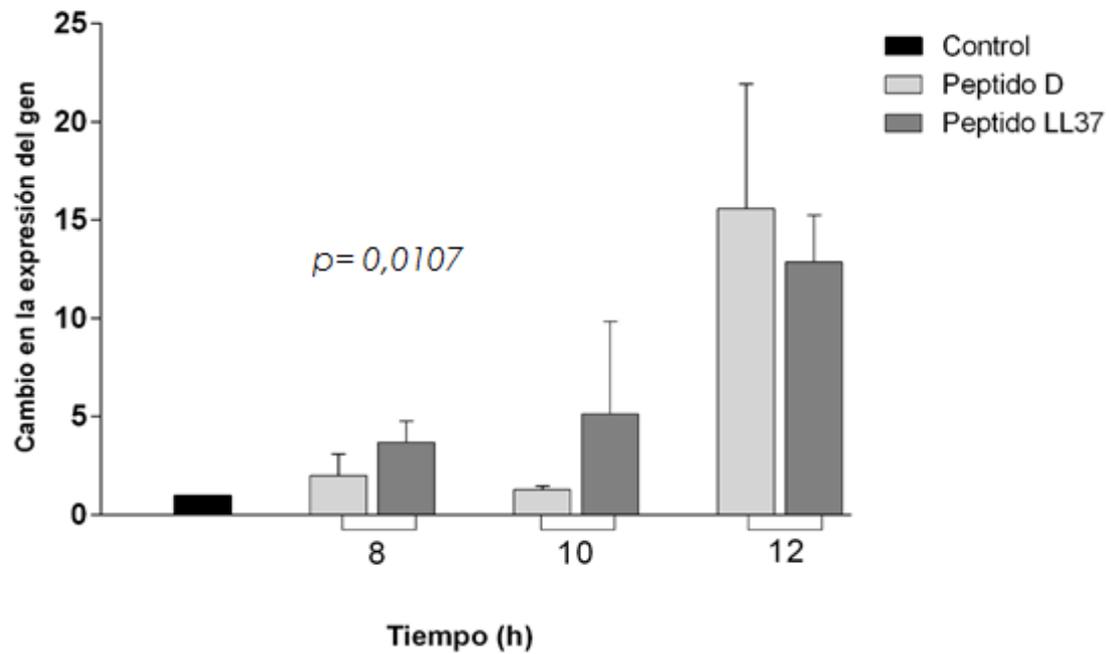
Gráfica N° 21. Análisis de expresión del gen *agrA* en la cepa de *S. aureus* COL81



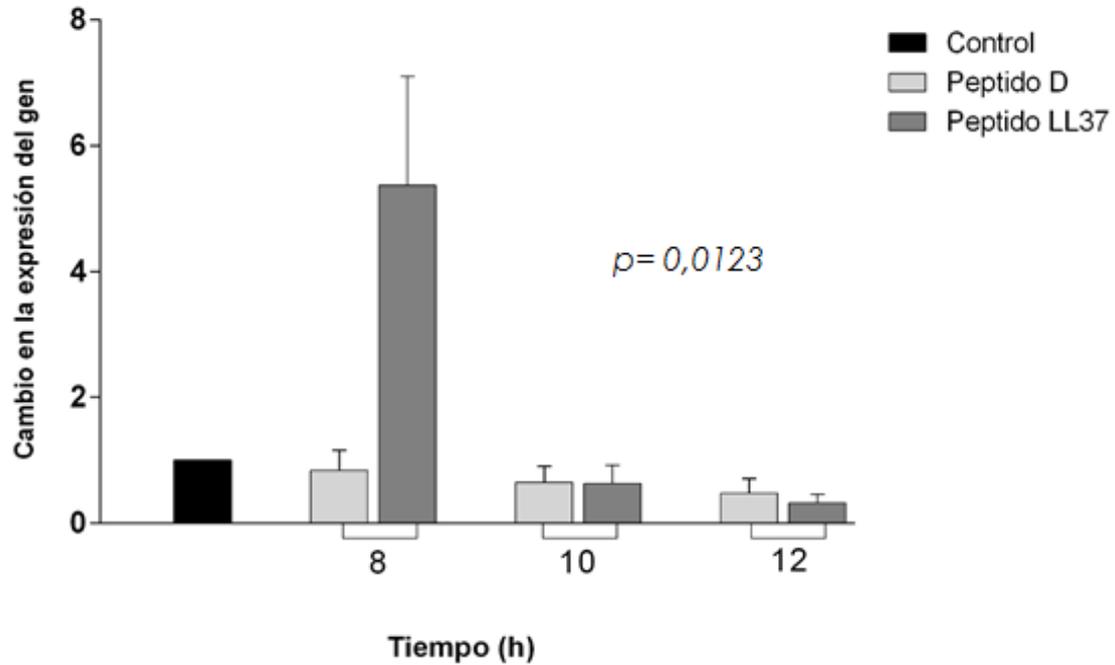
Gráfica N° 22. Análisis de expresión del gen *agrA* en la cepa de *S. epidermidis* 22-6



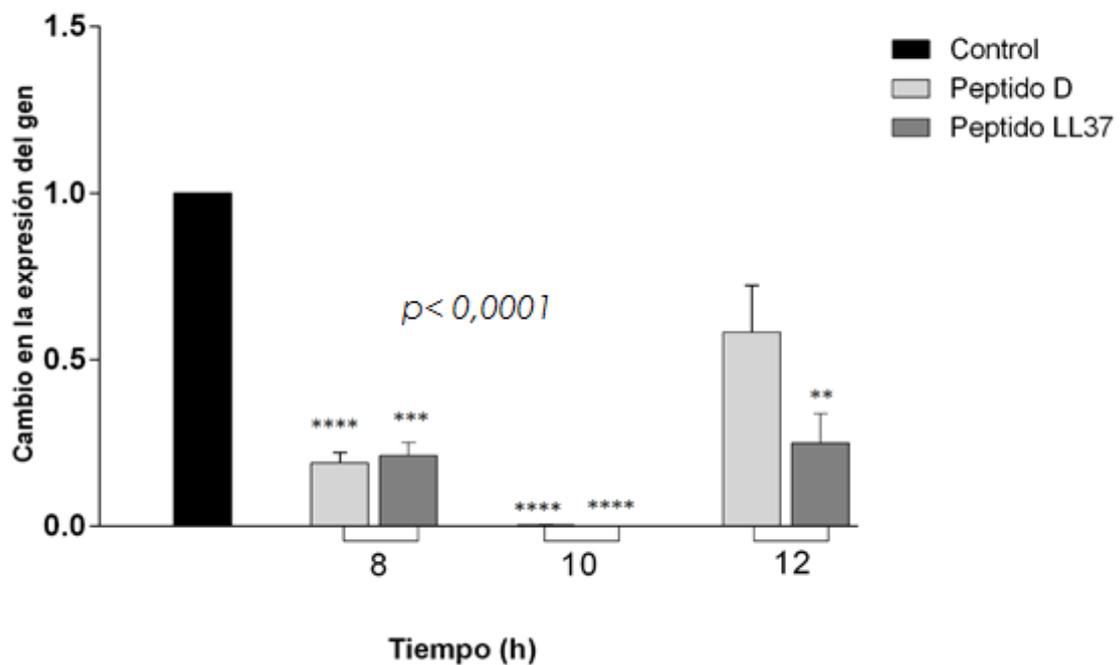
Gráfica N° 23. Análisis de expresión del gen *agrA* en la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228



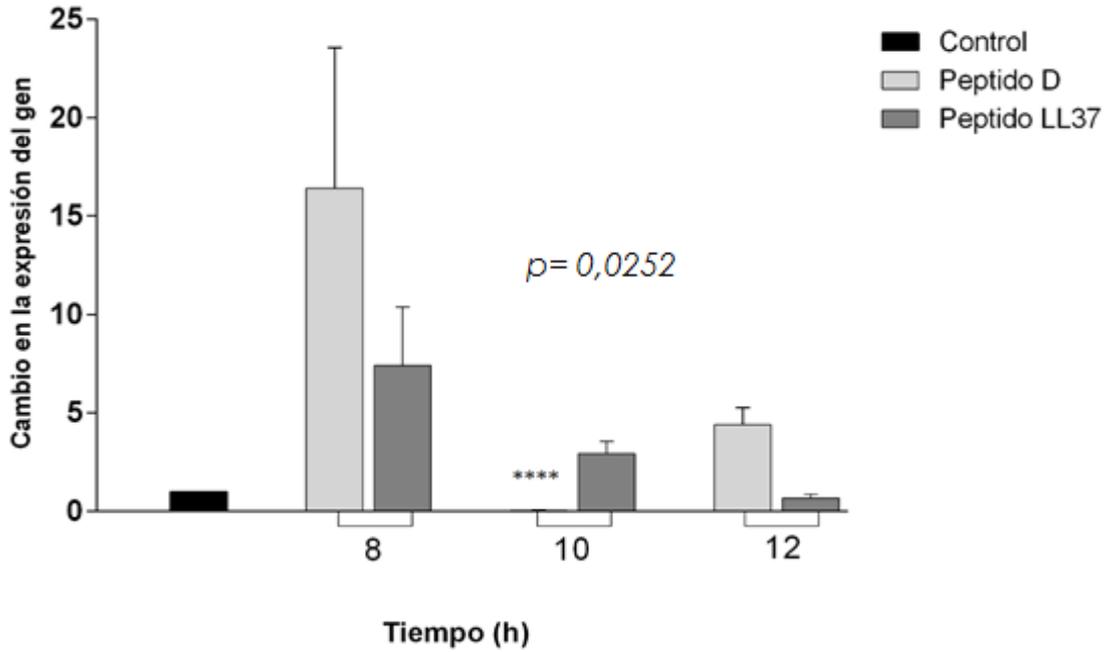
Gráfica N° 24. Análisis de expresión del gen *agrA* en la cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984



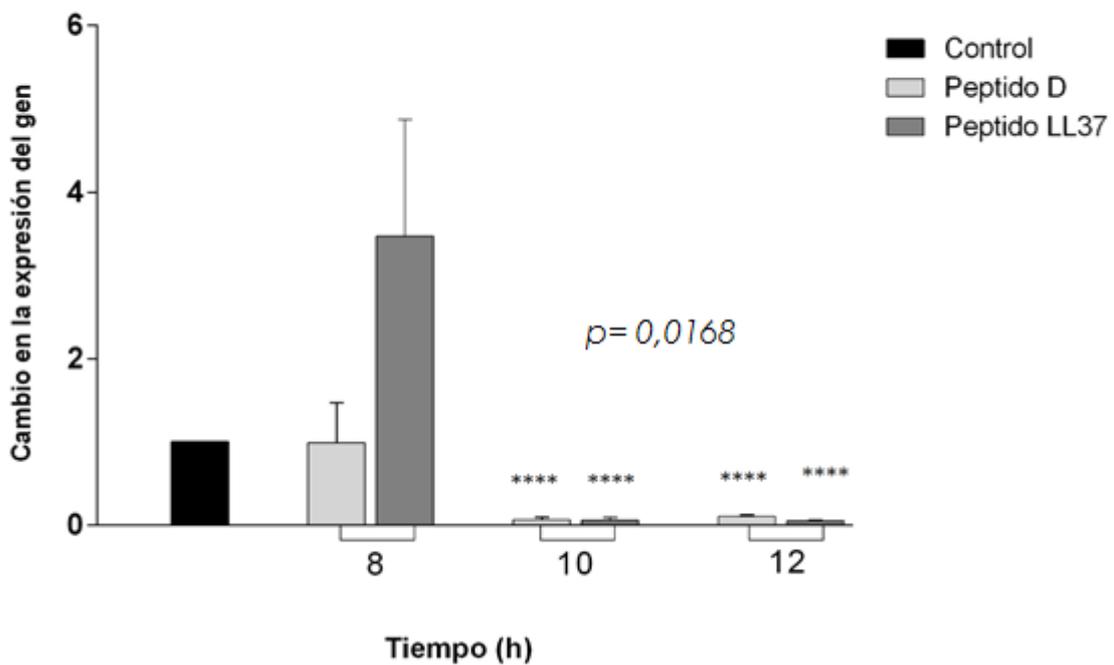
Gráfica N° 25. Análisis de expresión del gen *agrB* en la cepa de *S. epidermidis* 22-6



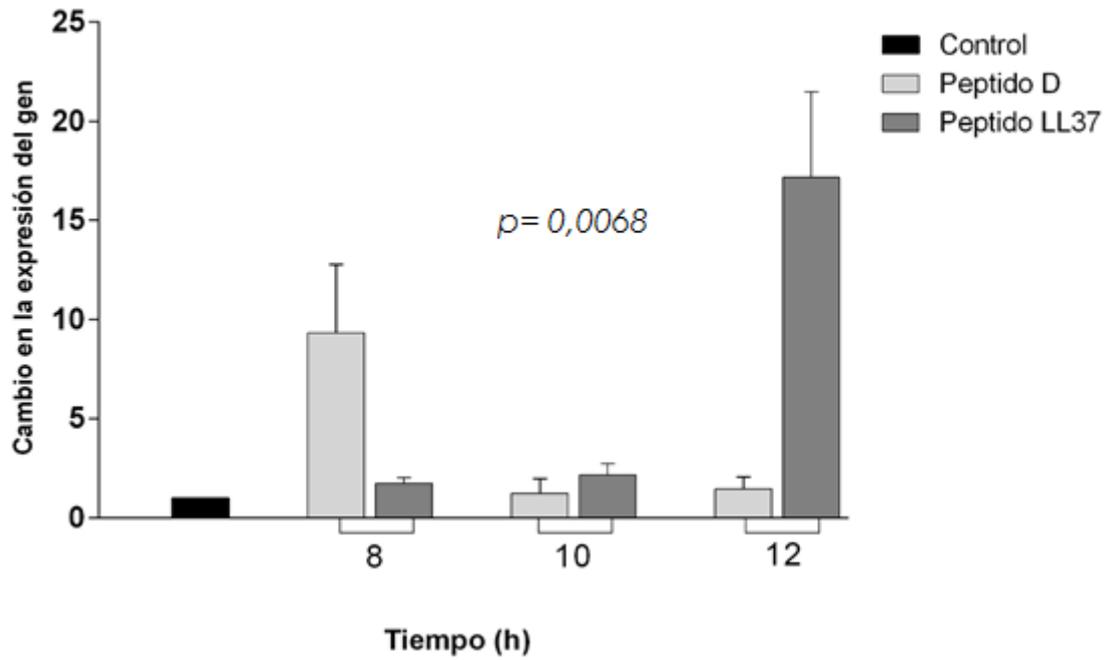
Gráfica N° 26. Análisis de expresión del gen *agrB* en la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228



Gráfica N° 27. Análisis de expresión del gen *agrB* en la cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984



Gráfica Nº 28. Análisis de expresión del gen *agrB* en la cepa de *S. aureus* COL81



Gráfica Nº 29. Análisis de expresión del gen *agrB* en la cepa de *S. aureus* ATCC USA300

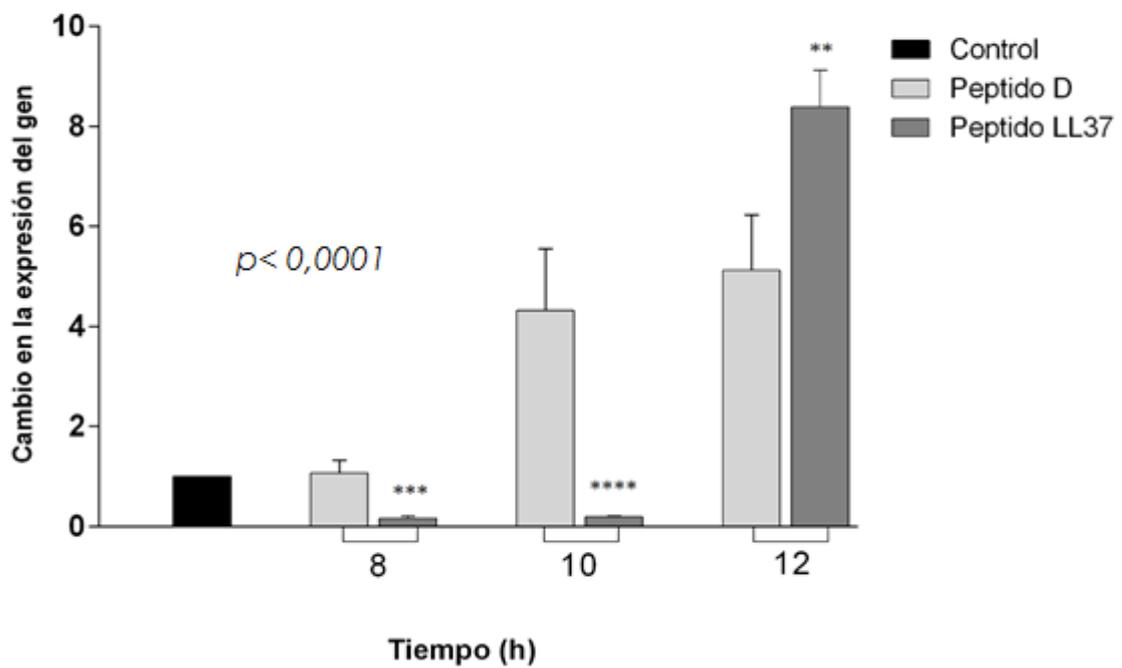


Tabla N° 4. Resultados del cambio en la expresión de los genes *agrA* y *agrB* después del tratamiento con los péptidos DLL-37 y LL37-1

Genes		<i>agrA</i>						<i>agrB</i>					
Horas		8 horas		10 horas		12 horas		8 horas		10 horas		12 horas	
<i>S. aureus</i>	ATCC USA300	1.0%	67.7% (***)	-218.7%	60.7% (**)	-200.4% (**)	-75.7%	-7.1%	83,5% (***)	-332.0%	80,6% (****)	-412.5%	-739,3 (**)
	Col81	57.1%	49.3% (**)	-11.1%	33.4% (**)	61.3% (***)	-966.4 (**)	-834.3%	-75.1%	-23.5%	-118.1%	-46.2%	-1617%
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	-100.5%	-268.4%	-28.4%	-413.8%	-1458.0%	-1187%	-1542.0%	-640.8%	95,3% (****)	-193%	-339%	32.6%
	ATCC 35984	15.9%	-437.0%	34.9%	36.9%	52.3%	67.9%	1.2%	-247.0%	93,7% (****)	94,4% (****)	89,7% (****)	94,7% (****)
	22-6	71,76% (**)	86,6% (***)	99,8% (****)	99,9% (****)	41.7%	75,0% (**)	81,0% (****)	78,7% (***)	99,8% (****)	99,9% (****)	41.7%	75,0% (**)
Péptido empleado		DLL-37	LL37-1	DLL-37	LL37-1	DLL-37	LL37-1	DLL-37	LL37-1	DLL-37	LL37-1	DLL-37	LL37-1

** p hasta 0,0021

*** p hasta 0,0002

**** p < 0,0001

DISCUSIÓN

S. aureus y *S. epidermidis*, en la actualidad están presentando una gran variedad de factores de virulencia como la formación de proteínas extracelulares de adhesión que permiten al organismo resistir a las defensas del huésped, mediante la degradación de las macromoléculas y elementos que pueden generar efectos citotóxicos en los órganos y tejidos afectados(30).

La producción de estos factores de virulencia es coordinada, controlada y compleja donde se involucran señales regulatorias relacionados con el factor de transcripción del QS (*agrA*), llevadas a cabo por el sistema *agr* en respuesta a la densidad poblacional.

A la totalidad de la cepas se les realizó PCR convencional empleando los primers *agrA*, *agrB* y *agrC* que se diseñaron en el grupo de investigación, pero no se observó amplificación para ninguna de las cepas de *S. epidermidis*, por la alta variabilidad genética para estas secuencias, y esto llevo a la necesidad de diseñar primers específicos para *S. epidermidis*, con los cuales si se evidenció amplificación.

En este estudio se encontró la presencia del gen *agrA* y *agrC* en el 100%, y el gen *agrB* en el 57,9% de las 19 cepas de *S. aureus*. En las cepas de *S. epidermidis* el 100% se evidenció la presencia del gen *agrA*, y el (76,4%) la presencia de *agrB*,

Sin embargo, estos resultados presentan alguna discrepancia con el estudio realizado por Turkey y colaboradores en el año 2018, donde encontraron que el 64.89% de las cepas presentaban el sistema *agr* pero que todas ellas eran formadoras de biopelícula; estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones geográficas y las fuentes de aislamientos, aunque todas las cepas evaluadas en el estudio fueran multidrogorresistentes y productoras de biopelícula (31).

En la tipificación de los Péptidos Autoinductores, de *S. aureus* se encontró que el 42.1% de la cepas presentan AIP tipo I, el 31.5% tipo II, el 10.5% tipo III, dos de las cepas estudiadas no presentaron homología con ninguno de los primers utilizados, estos resultados obtenidos, contrastan con los mencionado por

Choudhary *et al.*, que en el 2018 realizó el análisis de secuencias reportadas para *S. aureus* y encontró que 57,8% de las cepas poseen AIP I, 28,5% AIP II, 10,8% AIP III y 2,72 AIP IV (32).

Igualmente Jarraud *et al.*, que en el año 2001, por medio de la secuenciación de algunos de los genes del complejo encontró la siguiente distribución: 30,8% con AIP tipo I, 24,7% con AIP tipo II, 21,7% con AIP tipo III y 22,7% con AIP tipo IV (33), y Leeuwen *et al.* En el año 2000 encontró que la mayoría (92% de las cepas estudiadas) poseen el AIP tipo I mediante un análisis de RFLP's (34).

Podemos apreciar que al igual que en los estudios mencionados anteriormente, sin importar la diversidad de metodologías utilizadas y aunque en el estudio de Leeuwen no se presenten datos de la distribución de los otros tipos de AIP, se muestra la misma tendencia, en la cual el AIP tipo I es el más comúnmente encontrado, seguido del AIP II, AIP III y el AIP IV como el menos frecuente.

En *S. epidermidis*, de los tres AIP's reportados para *S. epidermidis*, solo la cepa 22- 82 presentó el tipo II (5,8%), el resto amplificó el tipo I (94,1%). Para *S. epidermidis*.

Para dar cumplimiento al tercer objetivo se realizó la expresión de los genes en estudio mediante una qPCR relativa con el fin de comparar y cuantificar dos condiciones diferentes, en ausencia y presencia de los péptido LL-37 y DLL-37 con el fin de determinar los cambios en los niveles del mRNA comparándolo con un control, a este se le aplicó un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un IC 99% mediante el test de análisis de varianza de Bonferroni.

Es por esta razón que podemos decir con certeza que en las cepas de *S. aureus*, presentan una disminución significativa de la expresión de *agrA* y *agrB* a las 8 y 10 horas con los péptidos DLL-37 y LL37-1 y un aumento a las 12 horas con el péptido DLL-37 para la cepa ATCC USA300 y que en estos resultados podemos observar la influencia de los péptidos LL-37 y DLL-37.

En las cepas de *S. epidermidis* se observa el siguiente comportamiento: en la 22-6 se observa disminución de la expresión a las 8 y 10 horas con ambos péptidos tanto para el gen *agrA* y *agrB* ($p:0.0001$); y a las 12 horas con el péptido LL37-1 en la cepa ATCC 35984 se observa disminución en las 10 y 12

horas con ambos péptidos para el gen *agrB* con el gen *agrA* se observa el mismo comportamiento, aunque este no tiene significancia estadística; y para la cepa ATCC 12228 únicamente se observa disminución de la expresión de *agrB* a las 10 horas con el péptido DLL-37.

Por lo anterior podemos decir que la expresión relativa de los genes *agrA* y *agrB*, para ambas cepas de *S. aureus* existe una disminución estadísticamente significativa de la expresión de la proteína reguladora del sistema (*agrA*) con el péptido LL-37 a las 8 y 10 horas; en las cepas de *S. epidermidis*, se encontró una disminución de la expresión de la proteasa modificadora del Péptido Autoinductor (*agrB*) con el péptido DLL-37 a las 10 horas en todas las cepas estudiados, el análisis estadístico mostro que los resultados tienen $p < 0.05$ con un nivel de confianza del 99%.

Estos resultados nos permiten observar que los péptidos LL-37 y DLL-37 pueden tal vez generen cambios en la expresión de factores de patogenicidad y como consecuencia generar la inhibición de la formación de biopelícula y la inhibición de la liberación de diferentes toxinas dependientes de la densidad poblacional que son responsables del daño tisular en patógenos como son los *S. aureus* y oportunistas como *S. epidermidis*.

Esto también demuestra que el efecto anti Quorum Sensing se conserva en estos péptidos derivados.

CONCLUSIÓN

Todas las cepas bacterianas estudiadas presentan al menos uno de los componentes evaluados que integran el sistema agr del Quorum sensing, lo que nos permite decir que todas las cepas estudiadas presentan este sistema de sincronización de comportamientos celulares.

El AIP I es el más frecuente encontrado en los aislamientos clínicos, aunque no fue posible relacionarlo con la procedencia de los mismos.

Los péptidos LL37-1 y DLL-37 reducen la expresión de los genes *agrA* y *agrB* en los aislamientos estudiados tanto como en las cepas ATCC usadas, aunque se observa un comportamiento diferente en cada especie bacteriana

BIBLIOGRAFIA

1. Weiner L, Webb A, Limbago B, Dudeck M, Patel J, Kallen A et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology* [Internet]. 2016 [cited 15 February 2018]; 37(11):1288-1301. Available from: <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/datastat/2014-AR-data-summary-nhsn.pdf>
2. London: Health Protection Agency. Surveillance of Surgical Site Infections in NHS Hospitals in England. Londres; 2012 p. 1- 32.
3. A report from the NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control* [Internet]. 2004 [cited 16 February 2018]; 32(8):470-485. Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/datastat/nnis_2004.pdf
4. Grupo Para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO). Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2016 Componente pediátrico y adulto Análisis de percentiles marcadores de resistencia 2016. Componente pediátrico y adulto. Tendencias de los principales marcadores de resistencia 2008-2016 [Internet]. Bogotá D. C.; 2017. Available from: http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Grebo_2017.PDF
5. Hancock R, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 2006; 24(12):1551-1557.
6. Epanand R, Vogel H. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1999; 1462(1-2):11-28.
7. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* [Internet]. 2004 [cited 29 November 2017]; 275(1):177-182. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979704001638>

8. Centers for Disease Controls, ROC (Taiwan). Nosocomial Infections Surveillance System. Available from: <https://www.cdc.gov.tw/english/info>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451395/pdf/zcm603.pdf>
9. Natsis NE, Cohen PR. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Jun 7. Doi: 10.1007/s40257-018-0362-9.
10. Kim M, Zhao A, Wang A, Brown Z, Muir T, Stone H et al. Surface-attached molecules control Staphylococcus aureus quorum sensing and biofilm development. *Nature Microbiology* [Internet]. 2017 [cited 20 July 2017];2:17080. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201780>
11. Banerjee G, Ray AK. Quorum-sensing network-associated gene regulation in Gram-positive bacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2017 Dec 1; 64(4):439-453. Doi: 10.1556/030.64.2017.040
12. Paulander W, Varming AN, Bojer MS, Friberg C, Bæk K, Ingmer H. The agr quorum sensing system in Staphylococcus aureus cells mediates death of sub-population. *BMC Res Notes*. 2018 Jul 24;11(1):503. Doi: 10.1186/s13104-018-3600-6.
13. Katherine Y. Le, Michael Otto. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1174. Published online 2015 Oct 27. Doi: 10.3389/fmicb.2015.01174.
14. Tan L, Li S, Jiang B, Hu X, Li S. Therapeutic Targeting of the Staphylococcus aureus Accessory Gene Regulator (agr) System. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 20 August 2018];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422887>
15. Geisinger E, Muir T, Novick R. agr receptor mutants reveal distinct modes of inhibition by staphylococcal autoinducing peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2009 [cited 20 August 2018]; 106(4):1216-1221. Available from: <http://www.pnas.org/content/pnas/early/2009/01/15/0807760106.full>

16. Thoendel M, Kavanaugh J, Flack C, Horswill A. Peptide Signaling in the Staphylococci. Chemical Reviews [Internet]. 2011 [cited 20 August 2018]; 111(1):117-151. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21174435>

17. Otto M, Süßmuth R, Jung G, Götz F. Structure of the pheromone peptide of the Staphylococcus epidermidis agr system. FEBS Letters [Internet]. 1998 [cited 18 January 2018]; 424(1-2):89-94. Available from: [https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/S0014-5793\(2898\)2900145-8](https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/S0014-5793(2898)2900145-8)

18. Saenz HL, Augsburg V, Vuong C, Jack RW, Götz F, Otto M. Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. Arch Microbiol. 2000 Dec; 174(6):452-5.

19. Linsheng Zhang, Guangyong Ji. Identification of a Staphylococcal AgrB Segment(s) Responsible for Group-Specific Processing of AgrD by Gene Swapping. J Bacteriol. 2004 Oct; 186(20): 6706–6713. Doi: 10.1128/JB.186.20.6706-6713.2004.

20. Sandeep K. Srivastava, Kalagiri Rajasree, Aneesa Fasim, Gayathri Arakere, Balasubramanian. Influence of the AgrC-AgrA Complex on the Response Time of Staphylococcus aureus Quorum Sensing. J Bacteriol. 2014 Aug; 196(15): 2876–2888. Doi: 10.1128/JB.01530-14.

21. Thoendel M, Horswill AR. Identification of Staphylococcus aureus AgrD residues required for autoinducing peptide biosynthesis. J Biol Chem. 2009 Aug 14; 284(33):21828-38. Doi: 10.1074/jbc.M109.031757.

22. Novick RP1, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Send to Annu Rev Genet.* 2008; 42:541-64. Doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640
23. Shurko JF, Galega RS, Li C, Lee GC. Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*. *J Antibiot (Tokyo).* 2018 Aug 17. Doi: 10.1038/s41429-018-0090-7
24. Gökçınar NB, Karabulut AA, Onaran Z, Yumuşak E, Budak Yıldırım FA. Elevated Tear Human Neutrophil Peptides 1-3, Human Beta Defensin-2 Levels and Conjunctival Cathelicidin LL-37 Gene Expression in Ocular Rosacea. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018 Aug 24:1-10. Doi: 10.1080/09273948.2018.1504971
25. Zeth K, Sancho-Vaello E. The Human Antimicrobial Peptides Dermcidin and LL-37 Show Novel Distinct Pathways in Membrane Interactions. *Front Chem.* 2017 Nov 7; 5:86. Doi: 10.3389/fchem.2017.00086
26. Peerayeh S, Azimian A, Nejad Q, Kashi M. Prevalence of agr Specificity Groups Among *Staphylococcus aureus* Isolates From University Hospitals in Tehran. *Laboratory Medicine.* 2009; 40(1):27-29.
27. Li M. Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (agr) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *Journal of Medical Microbiology.* 2004; 53(6):545-549.
28. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols [Internet].* 2006 [cited 25 April 2018]; 1(2):581-585. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.83>.

29. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2001 [cited 16 July 2018]; 29(9):45e-45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
30. Adhikari R, Arvidson S, Novick R. A Nonsense Mutation in *agrA* Accounts for the Defect in *agr* Expression and the Avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP::kan*. *Infection and Immunity* [Internet]. 2007 [cited 6 April 2018];75(9):4534-4540. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951176/>
31. Turkey A, Abed J, Suleiman A, Barzani K. Molecular assessment of accessory gene regulator (*agr*) quorum sensing system in biofilm forming *Staphylococcus aureus* and study of the effect of silver nanoparticles on *agr* system. *Iran J Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 14 July 2018];10(1):14- 21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922414>
32. Choudhary K, Mih N, Monk J, Kavvas E, Yurkovich J, Sakoulas G et al. The *Staphylococcus aureus* Two-Component System AgrAC Displays Four Distinct Genomic Arrangements That Delineate Genomic Virulence Factor Signatures. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 29 September 2018]; 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5981134/pdf/fmicb-09-01082.pdf>
33. van Leeuwen W, van Nieuwenhuizen W, Gijzen C, Verbrugh H, van Belkum A. Population Studies of Methicillin-Resistant and –Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains Reveal a Lack of Variability in the *agrD* Gene, Encoding a Staphylococcal Autoinducer Peptide. *Journal of Bacteriology* [Internet]. 2000 [cited 1 August 2018]; 182(20):5721-5729. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004170>
34. Jarraud S. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity* [Internet]. 2002 [cited 3 January 2018]; 70(2):631-641. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127674/pdf/0820.pdf>

ANEXOS

ANEXO Nº 1

Nomenclatura de las cepas empleadas en el estudio y su origen

En las tablas 1 y 2 se presentan los nombres asignados a las cepas estudiadas y su origen, así se mencionan en el desarrollo del escrito

Tabla Nº 1. Aislamientos clínicos de *S. aureus* y su procedencia

No. Cepa <i>S. aureus</i>	Origen
COL23	Hemocultivo
COL42	Hemocultivo
COL77	Secreción ocular
COL81	Hemocultivo
COL86	Hemocultivo
COL111	Infección de herida quirúrgica
COL145	Hemocultivo
COL190	Líquido peritoneal
COL207	Absceso de rodilla
COL208	Absceso de glúteo
COL227	Infección de herida quirúrgica
COL252	Absceso abdominal
COL318	Secreción orotraqueal
COL478	Secreción endotraqueal
5- 205	Desconocido
5- 302	Desconocido
5- 400	Desconocido
5- 410	Desconocido
5- 416	Desconocido

El origen, en caso de conocerse, se presenta para evaluar la relación existente con el tipo de AIP.

Tabla N° 2. Aislamientos clínicos de *S. epidermidis* y su procedencia

No. Cepa <i>S. epidermidis</i>	Origen
22- 6	Hemocultivo
22- 18	Hemocultivo
22- 39	Infección asociada a catéter
22- 45	Hemocultivo
22- 57	Hemocultivo
22- 58	Hemocultivo
22- 60	Hemocultivo
22- 61	Hemocultivo
22- 71	Hemocultivo
22- 72	Hemocultivo
22- 81	Hemocultivo
22- 82	Hemocultivo
22- 83	Hemocultivo
22- 84	Hemocultivo
22- 90	Hemocultivo
22- 91	Hemocultivo
24- 225	Desconocido

ANEXO N° 2

Estandarización de PCR convencional

Para estandarizar la PCR convencional se realizaron varias reacciones variando las concentraciones de los componentes o las condiciones a estandarizar y por medio de una electroforesis en gel de agarosa se seleccionó la temperatura en la cual se ve la mejor banda en la electroforesis (Un único producto de PCR del tamaño esperado, banda sólida en electroforesis, gran cantidad de producto de PCR).

Temperatura de melting

Para estandarizar la temperatura óptima a la cual la mitad de las moléculas de primers se hibridan con las cadenas de ADN molde se tomó en cuenta la fórmula de Wallace para calcular la temperatura de acuerdo a la conformación de bases nitrogenadas del primer:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Donde A: Adenina, T: Timina, G: Guanina, y C: Citosina

Se realizó una PCR convencional con gradiente de temperaturas en el termociclador Axygene MaxyGene™ variando la temperatura de melting 3 grados por encima y por debajo de la calculada utilizando la Master mix recomendada por Promega Corporation.

Concentración de Cloruro de magnesio (MgCl₂)

Para la determinación de MgCl₂ adecuada para la reacción se realizó la amplificación para cada uno de los genes estudiados variando la concentración de 3,0 Mm hasta 4,0 Mm (3,0, 3,6, 3,8 y 4,0 Mm).

Primers

Se variaron las concentraciones de los primers (0.25 uM, 0.5 uM, 0.75 uM y 1.0 uM) para amplificar cada uno de los genes estudiados.

ADN

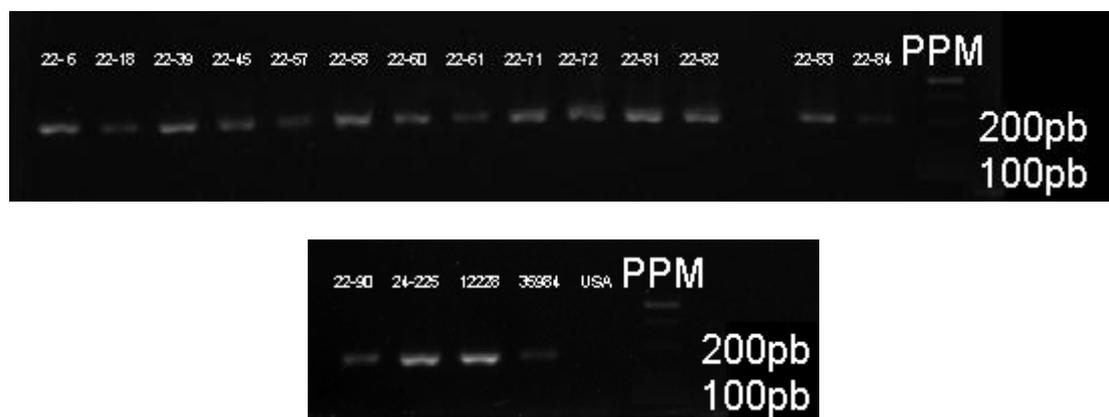
Se utilizaron concentraciones de 0.25 ng/uL, 0.5 ng/uL, 0.75 ng/uL y 1.0 ng/uL para hacer amplificaciones para cualquiera de los genes y se seleccionó la concentración a la que se logre ver en la electroforesis una banda con una intensidad de fluorescencia adecuada para la identificación del producto, definida, de un tamaño moderado.

ANEXO N° 3

Confirmación molecular de la identidad de las cepas

Se realizó confirmación de la identificación de las cepas estudiadas por medio de PCR convencional utilizando los primers dirigidos al ADN ribosomal 16s, a continuación se muestra la foto de la electroforesis en donde se confirmó que todas las cepas trabajadas presuntamente como *S. epidermidis* realmente corresponden a esta identidad.

Gráfica 1. Confirmación de género y especie para *S. epidermidis*



Como se puede visualizar en la imagen de la electroforesis la identidad del 100% de las cepas trabajadas de *S. epidermidis* fueron confirmadas por biología molecular

ANEXO N° 4

Resultados obtenidos en las PCR's convencionales

En las siguientes tablas se muestran de manera los resultados para cada una de las cepas de determinación de presencia de los genes y tipificación de los péptidos autoinductores

Tabla N° 3. Presentación de resultados de PCR convencional para *S. aureus*

No. Cepa S. aureus	agrA	agrB	agrC	Tipo agr
COL23	Positivo	Negativo	Positivo	II
COL42	Positivo	Positivo	Positivo	I
COL77	Positivo	Positivo	Positivo	I
COL81	Positivo	Negativo	Positivo	II
COL86	Positivo	Positivo	Positivo	I
COL111	Positivo	Negativo	Positivo	II
COL145	Positivo	Negativo	Positivo	II
COL190	Positivo	Negativo	Positivo	-
COL207	Positivo	Positivo	Positivo	I
COL208	Positivo	Positivo	Positivo	I
COL227	Positivo	Negativo	Positivo	II
COL252	Positivo	Positivo	Positivo	-
COL318	Positivo	Positivo	Positivo	II
COL478	Positivo	Negativo	Positivo	II
5- 205	Positivo	Positivo	Positivo	III
5- 302	Positivo	Positivo	Positivo	I
5- 400	Positivo	Negativo	Positivo	III
5- 410	Positivo	Positivo	Positivo	I
5- 416	Positivo	Positivo	Positivo	I
USA300	Positivo	Positivo	Positivo	I

Tabla N° 4. Presentación de resultados de PCR convencional para *S. epidermidis*

No.	Cepa	agrA	agrB	Tipo agr
	S. epidermidis			
22- 6		Positivo	Positivo	I
22- 18		Positivo	Negativo	I
22- 39		Positivo	Positivo	I
22- 45		Positivo	Positivo	I
22- 57		Positivo	Positivo	I
22- 58		Positivo	Positivo	I
22- 60		Positivo	Positivo	I
22- 61		Positivo	Negativo	I
22- 71		Positivo	Positivo	I
22- 72		Positivo	Positivo	I
22- 81		Positivo	Positivo	I
22- 82		Positivo	Negativo	II
22- 83		Positivo	Positivo	I
22- 84		Positivo	Positivo	I
22- 90		Positivo	Positivo	I
22- 91		Positivo	Positivo	I
24- 225		Positivo	Negativo	I
ATCC 35984		Positivo	Positivo	I
ATCC 12228		Positivo	Positivo	I