

Adhesión sobre superficies
plásticas de cepas clínicas
de *Staphylococcus*
epidermidis.

Plastic adhesion of
Staphylococcus epidermidis
clinic strains.

Raúl Rancel Salazar (alu0101311128@ull.edu.es)

Tutorizado por Juan Ramón Hernández Fernaud y Ana María Rodríguez Pérez

Grado en Biología, Universidad de La Laguna

Convocatoria de junio de 2023

Índice

1. Introducción.....	4
1.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
1.1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> como microorganismo mutualista	5
1.1.2 Caracteres de patogenicidad	5
1.2 Importancia clínica	6
1.2.1 Relación con los catéteres.....	7
1.3 Formación de biopelículas.....	8
1.4 Factores de adhesión.....	9
1.5 Métodos de prevención de la formación de biopelículas	11
2. Objetivos	12
3. Material y métodos	13
3.1 Cultivos bacterianos y cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	13
3.2 Mantenimiento de los cultivos puros	13
3.3 Evaluación de la adhesión de <i>Staphylococcus epidermidis</i> a superficies plásticas (polietileno tereftalato)	14
3.4 Evaluación de la adhesión sobre PET, bajo condiciones de estrés salino.....	14
3.5 Evaluación de la adhesión sobre PET saturado de proteínas del suero.....	15
3.6 Evaluación de la adhesión sobre diferentes materiales plásticos	16
4. Resultados	16
4.1 Pureza de las cepas.....	17
4.2 Evaluación de la adhesión sobre PET, bajo condiciones de estrés salino	18
4.3 Evaluación de la adhesión sobre PET saturado de proteínas del suero	20
4.4 Evaluación de la adhesión sobre diferentes materiales plásticos	21
5. Discusión.....	23
6. Conclusiones.....	25
7. Limitaciones	26
8. Bibliografía	27

Resumen

Staphylococcus epidermidis es un coco Gram positivo que se encuentra en la piel de los humanos como parte de la microbiota beneficiosa. Normalmente esta bacteria mutualista nos protege de otros patógenos, aunque bajo condiciones especiales ella misma puede actuar como patógeno oportunista. Una alta proporción de las infecciones causadas por *S. epidermidis* están asociadas a la contaminación, con biopelículas, de implantes médicos (catéteres, prótesis), constituyendo una de las mayores causas de infecciones nosocomiales a nivel mundial. La formación de biopelículas sobre los implantes es un factor de virulencia clave en las infecciones ocurridas por este patógeno oportunista, siendo la adhesión inicial crítica para el desarrollo de la patología. Conocer como las diferentes superficies (diferentes tipos de plásticos, titanio) o la presencia de determinadas sustancias (fluidos corporales, drogas, antimicrobianos) afecta a la adhesión de *S. epidermidis* puede ser clave para prevenir la formación de las biopelículas maduras. En este estudio, empleamos dos cepas clínicas de *S. epidermidis* para evaluar su capacidad de adhesión bajo condiciones de estrés, en presencia de suero y sobre diferentes superficies plásticas. Observamos que ambas cepas se adhieren mejor bajo condiciones de estrés salino y pierden la capacidad de adhesión en superficies recubiertas por las proteínas del suero, bajo las mismas condiciones. Cada una de las cepas mostró una especificidad de adhesión diferente dependiendo del tipo de plástico ensayado. Nuestros resultados demuestran la versatilidad en la capacidad de adhesión de las cepas patógenas de *S. epidermidis*, dependiente de las condiciones externas.

Palabras clave: adhesión, catéter, nosocomial, infección, biopelículas, *S. epidermidis*.

Abstract

Staphylococcus epidermidis is a Gram-positive coccus found on human skin as part of the beneficial microbiota. Normally this mutualistic bacterium protects us from other pathogens, although under special conditions it can itself act as an opportunistic pathogen. A high proportion of infections caused by *S. epidermidis* are associated with biofilm contamination of medical implants (catheters, prostheses), constituting one of the major causes of nosocomial infections worldwide. The formation of biofilms on implants is a key virulence

factor in infections caused by this opportunistic pathogen, being the initial adhesion critical for the development of the pathology. Knowing how different surfaces (different types of plastics, titanium) or the presence of certain substances (body fluids, drugs, antimicrobials) affect the adhesion of *S. epidermidis* may be key to prevent the formation of mature biofilms. In this study, we used two clinical strains of *S. epidermidis* to evaluate their ability to adhere under stress conditions, in the presence of serum and on different plastic surfaces. We observed that both strains adhere better under salt stress conditions and lose adhesion ability on surfaces coated by serum proteins under the same conditions. Each of the strains showed different adhesion specificity depending on the type of plastic tested. Our results demonstrate the versatility in the adhesion capacity of pathogenic strains of *S. epidermidis*, dependent on external conditions.

Key words: adhesion, catheter, nosocomial, infection, biofilm.

1. Introducción

1.1. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis, es una especie de bacteria perteneciente al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales* y familia *Staphylococcaceae* (Schoch et al., 2020). Es un coco Gram positivo, coagulasa negativo, anaerobio facultativo, inmóvil y que no tiene la capacidad de formar esporas (Namvar et al., 2014). Otras especies del género pertenecientes al grupo de los estafilococos coagulasa negativos y potencialmente patógenos son *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. caprae* o *S. capitis*, entre otros (Argemi et al., 2019). Otra especie bien conocida del género es el patógeno *S. aureus*, siendo este coagulasa positivo (Hirose et al., 2022).

S. epidermidis es un miembro habitual de la microbiota de la piel, axilas, narinas, cabeza y mucosa en humanos, siendo un organismo mayoritariamente mutualista que contribuye a formar una barrera protectora en la piel frente a otros patógenos oportunistas (Severn & Horswill, 2023). Sin embargo, también puede comportarse como un patógeno oportunista. Una de sus características es la capacidad de formación de biopelículas robustas sobre superficies abióticas y bióticas, independientemente de si mantienen una relación mutualista con el hospedador o si actúa como patógeno oportunista (Schilcher & Horswill, 2020).

1.1.1 *Staphylococcus epidermidis* como microorganismo mutualista

El mutualismo se define como una relación entre dos organismos en la que ambos se ven beneficiados. Como regla general, cada organismo se encuentra al menos dentro de una relación mutualista, lo que pone de manifiesto su importancia para la vida (Stone, 2020). Los microorganismos mutualistas, que conforman la microbiota residente de la piel, se encuentran en homeostasis con el hospedador, al contrario que los patógenos, los cuales habitan la piel de forma transitoria (Dréno et al., 2020). Nuestra piel está habitada por una composición única y muy variada de microorganismos, donde destaca una población de bacterias coagulasa negativas, siendo la más abundante *S. epidermidis* (Severn & Horswill, 2023). Esta bacteria encuentra en la piel las condiciones idóneas para su crecimiento, como son una temperatura de entre 31,8°C y 36,6°C y un pH entre 4,2 y 7,9, siendo estos los dos factores principales que afectan a su crecimiento (Fournière et al., 2020). *S. epidermidis* es un microorganismo de gran importancia, ya que mantiene una relación mayoritariamente mutualista con los humanos, encontrándose de manera ubicua en todos nosotros y durante toda nuestra vida (Dong et al., 2018). *S. epidermidis* nos ofrece una barrera protectora frente a patógenos, principalmente mediante la ocupación de los nichos ecológicos de la piel y la competición por los nutrientes, dificultando la proliferación de otros microorganismos. Otros mecanismos de esta bacteria frente a los patógenos son la producción de bacteriocinas o moléculas inductoras de los queratinocitos, sebocitos y células inmunes del hospedador para la producción de péptidos antimicrobianos. Curiosamente, las cepas no patógenas de *S. epidermidis* tienen la capacidad de inhibir la adhesión de cepas patógenas de *S. epidermidis* y *S. aureus*, evitando la formación de biopelículas mediante la secreción de bacteriocinas producidas bajo el control del sistema quorum-sensing, metaloproteinasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular y modulinas solubles en fenol (Fournière et al., 2020).

1.1.2 Caracteres de patogenicidad

Un patógeno oportunista necesita esquivar a las defensas del hospedador mediante diferentes mecanismos para aumentar su supervivencia. *S. epidermidis* dispone de diferentes mecanismos para llevar a cabo esta evasión siendo uno de ellos la producción del exopolímero ácido poli- γ -glutámico (PGA), sintetizado por el locus cap. Este polímero protege a la bacteria

de la acción de los neutrófilos y de los péptidos antimicrobianos sintetizados por el sistema inmune del hospedador. La actividad de los genes encargados de la síntesis de este polímero se ve incrementada en la fase de crecimiento de la biopelícula (Otto, 2009). Otro mecanismo es la resistencia a los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP) sintetizados por el hospedador, *S. epidermidis* cuenta con los complejos ApaXRS VraFG, encargados de aumentar la carga positiva de la superficie celular, haciendo así que repela a los CAMP (Costa et al., 2021) Además, *S. epidermidis* presenta genes de resistencia a antibióticos muy extendidos entre sus cepas, destacando la resistencia a la meticilina, la cual se encuentra en un alto porcentaje de aislados clínicos, entre el 75% y 90% de los aislados clínicos. Esta resistencia viene dada por el casete cromosómico estafilocócico mec (SCCmec), el cual contienen al gen mecA que codifica una proteína de unión a la penicilina con baja afinidad por los betalactámicos. Esta no es la única resistencia que presenta *S. epidermidis*, existen cepas con resistencia a otros antibióticos como rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y sulfonamidas (Otto, 2009).

1.2 Importancia clínica

A pesar de ser una bacteria que normalmente es inofensiva, *S. epidermidis* puede comportarse como un patógeno oportunista, normalmente asociado a su capacidad para formar biopelículas sobre los implantes médicos (Büttner et al., 2015). Normalmente afecta, con mayor frecuencia, a pacientes con factores que facilitan su infección como las patologías previas, defectos inmunitarios, inmunodeficiencia provocada por trasplantes de órganos o neutropenia causada por quimioterapia (Moris et al., 2022). La principal fuente de contaminación, a la hora de una intervención, es la microbiota propia de la piel del paciente y del personal sanitario, constituida en parte por las bacterias *S. epidermidis* y *S. aureus*. A la hora de implantar el dispositivo médico, cualquier contacto con la piel es suficiente para que este quede contaminado (Moris et al., 2022). La principal causa de infección por *S. epidermidis*, es la incorrecta desinfección de la piel del paciente a la hora de introducir el implante. Este hecho es bastante frecuente en los servicios de urgencia, donde la vida del paciente corre peligro y no se toman las medidas preventivas y asépticas necesarias para evitar la infección. Una vez el dispositivo ha sido colonizado por una biopelícula, estas suelen ser difíciles de erradicar pues son resistentes a la mayoría de los antibióticos, obligando a la extracción del elemento contaminado (Leong et al., 2022). En consecuencia, las

contaminaciones de los implantes médicos por *S. epidermidis* implica que el paciente sufre complicaciones médicas, más allá de las originales, complicando su recuperación y poniendo en riesgo su supervivencia. Además, añade una carga adicional al sistema de salud, alargando la estancia de los pacientes y consumiendo recursos sanitarios, siempre necesarios.

1.2.1 Relación con los catéteres

S. epidermidis es responsable de la mayoría de las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres en Estados Unidos y en las unidades de cuidados intensivos de Alemania (Büttner et al., 2015). Se estima que entre un 60% y 70% de las infecciones nosocomiales son producidas por dispositivos médicos contaminados. Algunos de los implantes que sufren riesgo de ser contaminados son las prótesis cardíacas, implantes ortopédicos, implantes mamarios de silicona, implantes dentales, catéteres intravasculares y marcapasos (Moris et al., 2022). Existen varias maneras por las cuales *S. epidermidis* puede colonizar y formar una biopelícula sobre un catéter, aunque la fuente primaria de contaminación es la piel del propio paciente (Figura 1).

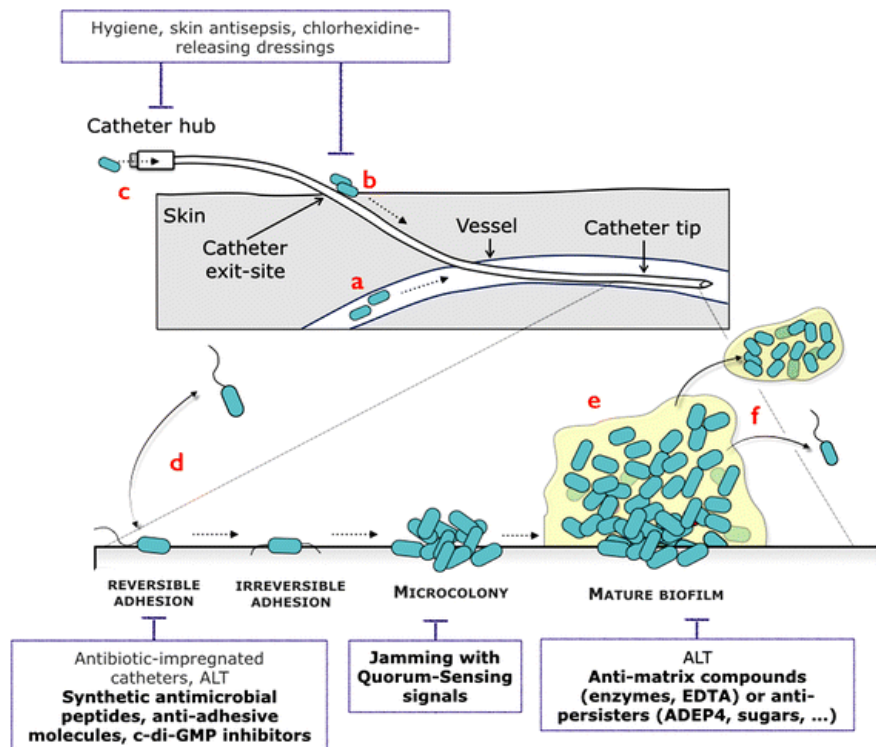


Figura 1. Representación de las vías de contaminación y posterior formación de la biopelícula sobre un catéter venoso central. **a:** contaminación proveniente de una infección previa en el riego sanguíneo del paciente. **b:** contaminación proveniente de la piel del paciente, previa a la implantación del catéter.

c: contaminación producida en el conector del catéter al entrar en contacto con la piel del paciente. d: esquema de evolución desde la colonización del catéter, e: la formación de la biopelícula madura y f: la dispersión de bacterias (Beloin et al., 2017).

1.3 Formación de biopelículas

“Una biopelícula es una asociación de bacterias encerradas en una matriz extracelular autoproducida que presenta un patrón único de crecimiento y expresión génica. Además, suele estar asociado a una superficie de adhesión”. Las biopelículas son la forma más común en la que se encuentran en la naturaleza muchas especies bacterianas, esto es debido a que la arquitectura de esta formación confiere a la bacteria una resistencia mayor frente a agresiones ambientales, como la radiación ultravioleta o sustancias antimicrobianas. Esto hace que las bacterias que forman biopelículas sean más resistentes que las bacterias platónicas (Moris et al., 2022). La formación de la biopelícula se puede dividir en 4 fases (Figura 2): adhesión, agregación, maduración y desprendimiento. En este trabajo nos centraremos en la primera fase de adhesión, siendo esta fase determinante para la posterior formación de la biopelícula, y donde intervienen las fuerzas fundamentales (fuerzas de van der Waals, hidrofobicidad, etc.) y la interacción específica entre el sustrato y las proteínas de la bacteria (Leong et al., 2022). Las biopelículas se puede dividir en 3 capas diferentes en función de su posición: la capa más profunda es la que se encuentra en contacto directo con la superficie a la cual se adhiere, una capa intermedia y compacta de bacterias que se encuentra sobre la capa anterior y una última capa superficial recubriendo, en la que las bacterias pueden proliferar y expandir la biopelícula.(Leong et al., 2022).

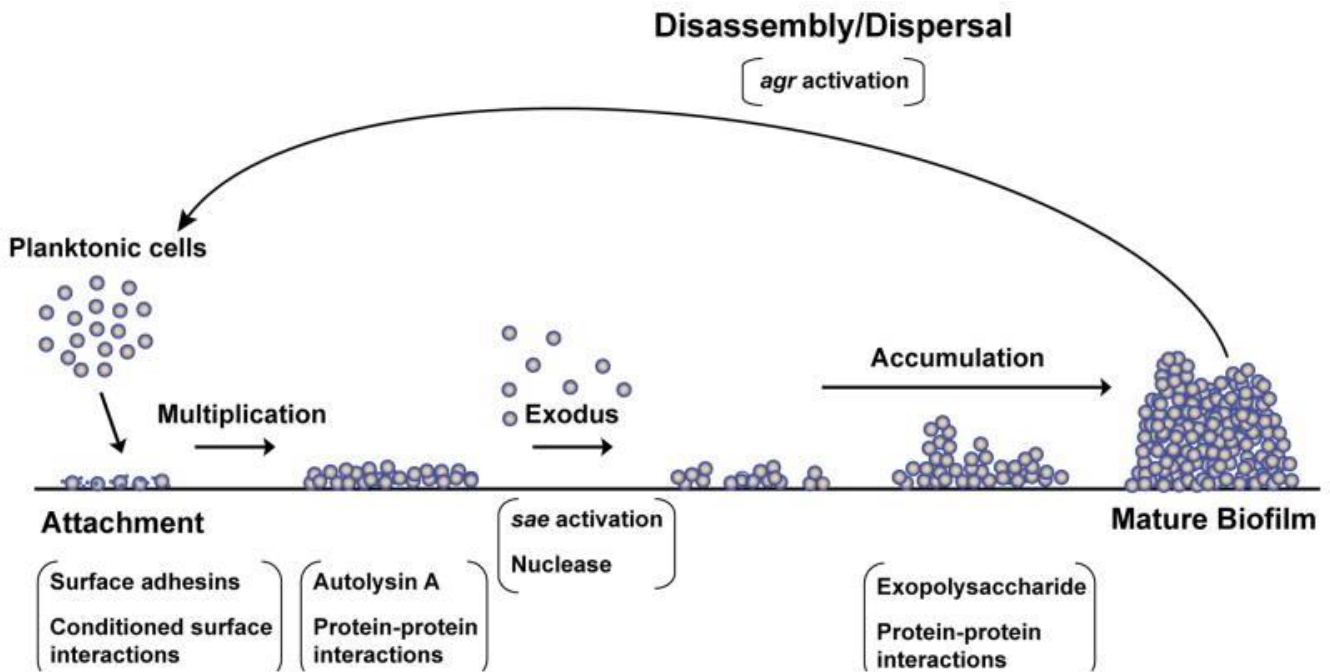


Figura 2. Representación de las fases de formación de una biopelícula bacteriana. Tras la adhesión inicial, la bacteria se multiplica y forma microcolonias, que aumenta en número de células y secreción de la matriz hasta llegar formar la biopelícula madura, de la cual se desprenden bacterias que colonizarán nuevas áreas (Paharik & Horswill, 2016).

1.4 Factores de adhesión

La adhesina de polisacárido intercelular (PIA) es una de las sustancias poliméricas extracelulares más importantes que componen la matriz de las biopelículas de *S. epidermidis*, cuya función principal es la de adherir las células a las superficies. El operón *icaABCD*, constituido por 4 componentes, es el encargado de codificar las proteínas de síntesis y transporte de la PIA. Las proteínas *icaA* e *icaD* sintetizan el polímero intercelular a partir de monómeros de N-acetilglucosamina que es exportado al exterior por *IcaC*. Finalmente, el polímero es deacetilado por *IcaB*, obteniendo así un carácter catiónico, fundamental para la adhesión (Figura 3)(Otto, 2009).

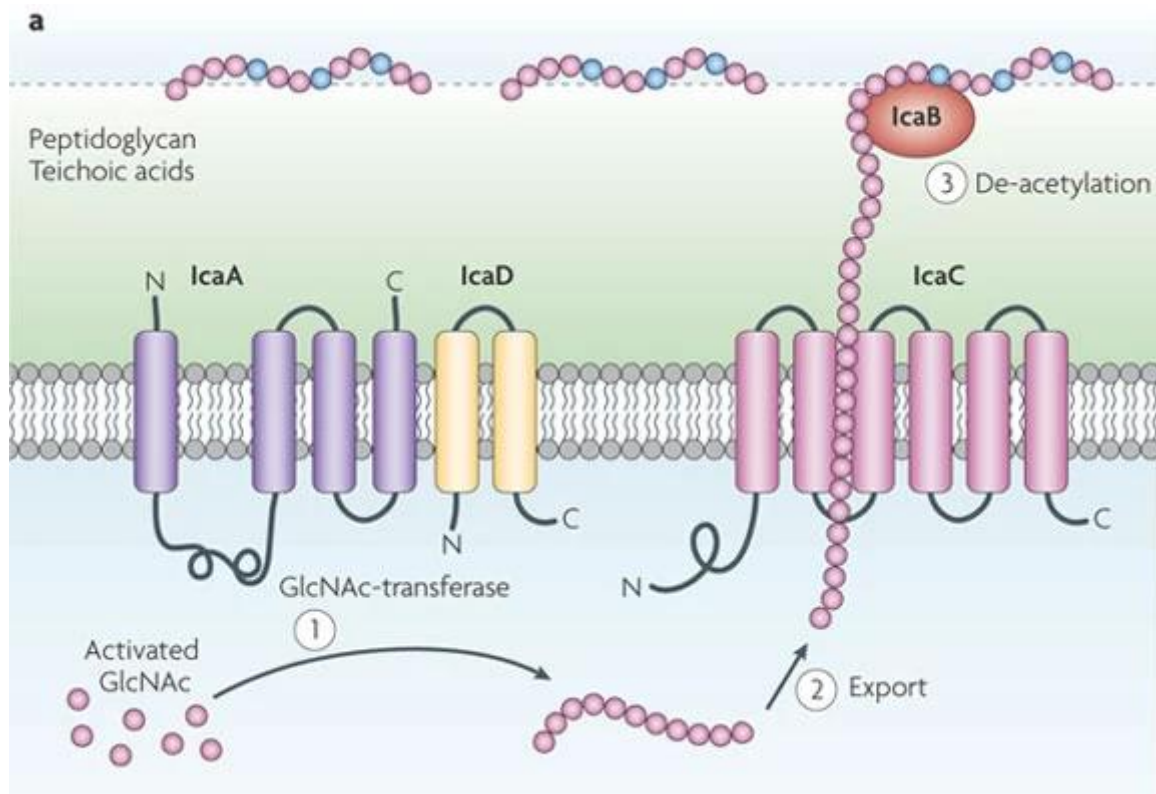


Figura 3. Representación de la síntesis del exopolisacárido poli-N-acetilglucosamina (PNAG o PIA). 1: La transferasa de membrana IcaA sintetiza PIA a partir de β 1-6 N-acetilglucosamina (GlcNAc) parcialmente desacetilado, para que ocurra la síntesis es necesaria la proteína de membrana IcaD. 2: La cadena sintetizada de PIA es probablemente exportada por la proteína de membrana IcaC. 3: Tras esto, la desacetilasa IcaB elimina algunos grupos N-acetilo, obteniendo el polímero un carácter catiónico, esencial para la adhesión. Figura modificada de (Otto, 2009).

La importancia de estos genes queda patente en el hecho de que las cepas de *S. epidermidis*, involucradas en las infecciones nosocomiales, correlacionan con la presencia del gen *icaA*. Debido a que la síntesis de la PIA es un proceso que consume mucha energía, las bacterias pueden producir biopelículas independientes de la PIA, compuestas de proteína (Ahmad et al., 2022). En este sentido, los componentes de superficie microbianos capaces de reconocer moléculas de la matriz adhesiva (cuyo acrónimo es MSCRAMM) se encuentran en las cepas que producen biopelículas pero que carecen de la maquinaria para la síntesis de la PIA (Ahmad et al., 2022). Los MSCRAMMs son el mayor grupo de proteínas de superficie codificadas por la bacteria siendo alguna de sus funciones favorecer la adhesión, evadir la respuesta inmunitaria y formar las biopelículas (Foster et al., 2014). Por ejemplo la proteína SdrG favorece la adhesión de la bacteria a fibrinógeno, proteína del plasma que recubre los

implantes (Foster, 2020). Otras proteínas promueven adhesiones específicas a materiales abióticos como:

- a) SdrF que favorece la adhesión sobre el polímero hidrofóbico llamado Dacron, empleado como cobertura de los cables que dan suministro eléctrico a los dispositivos de asistencia ventricular (Foster, 2020).
- b) La autolisina AtlE que pertenece al grupo de proteínas peptidoglucano-hidrolasas, teniendo un papel importante en la degradación de la pared celular bacteriana y la adhesión a poliestireno (Büttner et al., 2015).
- c) La proteína de membrana Aap posee un dominio A, encargado de la adhesión a superficies abióticas, pero que debe ser eliminado de manera total o parcial, por proteasas, para favorecer la acumulación de biopelículas (Foster, 2020).
- d) La proteína Bhp (proteína homóloga a Bap), favorece la adhesión y solo se ha encontrado en aislados clínicos, donde correlaciona con la capacidad patogénica de la bacteria (Guo et al., 2019).

Otros factores extrínsecos a las bacterias y que afectan a la adhesión son las cualidades físico químicas de la superficie o la composición del medio en el que se produce. Por ejemplo, la rugosidad afecta a la disponibilidad de superficie para la adhesión, siendo los materiales más rugosos favorecedores de la adhesión. Otras veces la relación no es tan evidente, por ejemplo, la dureza del material afecta a la adhesión de forma inversa dependiendo de si el material es hidrofóbico o hidrofílico. Si el material es hidrofílico, la adhesión aumenta con la dureza, ocurriendo lo contrario en materiales hidrofóbicos (Cromwick, M., & Petroff, H, 2020).

1.5 Métodos de prevención de la formación de biopelículas

La principal estrategia para evitar la formación de biopelículas, como ya mencionamos, es la correcta ejecución de los procedimientos por el personal sanitario, a fin de prevenir la adhesión de la bacteria al implante. Pero no siempre esta premisa es posible, es por eso que como medida complementaria la superficie de los implantes se modifican o impregnan de sustancias antimicrobianas (minociclina y rifampicina) para evitar la adhesión inicial (Leong et al., 2022). Por ejemplo, los implantes se pueden cubrir con una sustancia hidrófila conocida como polivinil pirrolidona que ayuda la absorción del antibiótico aplicado en una solución

acuosa. O se podría emplear este procedimiento como lavado cuando se realice una revisión del implante, reduciendo significativamente la tasa de infección (Leong et al., 2022).

En determinados casos, se han llegado a usar métodos biológicos como prevención de la contaminación de los implantes, usando bacterias comensales para ocupar las superficies, evitando así que bacterias patógenas puedan adherirse, aunque su uso clínico es incierto (Leong et al., 2022). Otros métodos biológicos, más dirigidos y por tanto más realistas con su aplicación clínica, emplean métodos enzimáticos dirigidos a desprender las bacterias una vez ya están adheridas, por digestión de la matriz extracelular.

También se emplean métodos mecánicos y físicos para desprender las biopelículas, pero quizás estos tienen más aplicación en la recuperación de los patógenos que en la limpieza del implante. Por ejemplo, el molino de bolas somete los implantes contaminados a un proceso abrasivo con bolas de acero de 1 mm de diámetro o el sonicador de ultrasonidos los desprende por el fenómeno de cavitación (Moris et al., 2022).

2. Objetivos

La prevención de la formación de las biopelículas, por *S. epidermidis*, sobre los implantes médicos es crítica para disminuir la incidencia actual de las infecciones nosocomiales. En este trabajo hemos considerado dos factores que afectan a la capacidad de adhesión de *S. epidermidis*: primero la diversidad de sustancias (fluidos corporales, soluciones antisépticas, soluciones salinas, etc.) a la que están expuestos algunos implantes de larga duración, como los catéteres venosos centrales a lo largo de su vida útil y, segundo, la diversidad de materiales plásticos empleados en la construcción de los implantes. A fin de investigar cómo estas variables afectan a la adhesión de dos cepas de *S. epidermidis* hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la adhesión de dos cepas clínicas de *S. epidermidis* al material plástico, bajo condiciones de estrés salino.
2. Evaluar la influencia de la adsorción de proteínas del suero, sobre las superficies plásticas, en la adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis*.
3. Determinar entre diferentes tipos de plásticos, empleados en los hospitales, aquellos que favorecen la adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis*.

3. Material y métodos

3.1 Cultivos bacterianos y cepas de *Staphylococcus epidermidis*

El medio empleado para el cultivo de los microorganismos fue caldo nutritivo (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante para los cultivos en medio líquido (8 gr/l). El medio sólido preparado para el mantenimiento de las cepas fue el mismo caldo nutritivo suplementado con 1,5% de agar (Merck). En todos los casos los componentes del medio se disolvieron con agitación y se esterilizaron en autoclave (Selecta) durante 20 min a 121°C.

Las cepas de *S. epidermidis* ensayadas se obtuvieron de muestras de pacientes del Hospital de La Candelaria (S/C de Tenerife). Ambas cepas han sido cedidas por el Dr. Eduardo Pérez Roth (Área de Microbiología de la ULL). La cepa denominada 6924-20 fue aislada de un hemocultivo el 17/06/2008 por el servicio de cirugía digestiva del hospital y es resistente a la penicilina y a mupirocina. La cepa 2037-25 fue aislada de un catéter el 25/07/2008 por la unidad de medicina intensiva y es resistente a penicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, fosfomicina, clindamicina, eritromicina, tetraciclinas, gentamicina, tobramicina, ácido fusídico, ciprofloxacina y mupirocina. Además, se empleó *S. aureus* (Colección Española de cultivo tipo, CECT) como control comparativo con las cepas clínicas de *S. epidermidis*. Se eligió *S. aureus* por ser del mismo género que *S. epidermidis* y por ser un patógeno oportunista que ha sido estudiado ampliamente, por lo cual se conocen bien sus caracteres patogénicos como es la producción de PIA (Idrees et al., 2021).

3.2 Mantenimiento de los cultivos puros

Las cepas de microorganismos se conservan a -80°C y antes de su uso experimental se inocularon en siembra por agotamiento en placas de Petri conteniendo agar nutritivo. Se incubaron durante 24 h a 37°C y las colonias aisladas se sometieron a la tinción de Gram, la prueba de la catalasa (30% peróxido de hidrógeno), oxidasa (Microbact), coagulasa (plasma de conejo Biomerieux), DNasa (DNasa agar, Sigma Aldrich), fermentación de manitol (agar salino manitol, Millipore) y hemólisis en agar sangre (Oxoid). Aquellas colonias de cocos Gram positivos, catalasa positivos y oxidasa negativos fueron sembradas en medio agar nutritivo a fin de garantizar su pureza. Las cepas se conservaron en las placas de Petri selladas a 4°C hasta su uso, máximo 7 días. Los microorganismos se preinocularon en caldo nutritivo y se crecieron a 37°C, 90 rpm durante 24 h antes de su uso experimental.

3.3 Evaluación de la adhesión de *Staphylococcus epidermidis* a superficies plásticas (polietileno tereftalato)

Una gran parte del instrumental sanitario plástico está constituido por polietileno tereftalato (PET), dada su resistencia mecánica y química, biocompatibilidad y su alta uniformidad (Çaykara et al., 2020). Sobre su superficie se adhieren las bacterias que pueden llegar a formar biopelículas y provocar daños al paciente, por tanto, determinar la capacidad de adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis* a la superficie del PET es un factor de virulencia.

Con el fin de confirmar que las cepas clínicas de *S. epidermidis* son capaces de adherirse a PET, se realizó un ensayo preliminar en el que las bacterias (*S. aureus* y *S. epidermidis* cepas 6924-20 y 2037-25) se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 ml) conteniendo 25 ml de caldo nutritivo. A continuación, se introdujeron cuadrados de PET de 2x2 cm, desinfectados previamente por inmersión en alcohol (75%) durante 15 min, se introdujeron en los matraces inoculados y estos se incubaron a 37°C, 90 rpm, durante 24 h. La condición control se preparó de igual forma, pero no se inocularon bacterias. Las condiciones experimentales se ensayaron por triplicado (n=3). Tras la incubación, todos los cuadrados de PET se extrajeron, se lavaron con abundante agua tres veces y se depositaron sobre un portaobjetos. Finalmente, las bacterias adheridas se tiñeron con cristal violeta (1 min), lavaron con abundante agua, secaron al aire y se procedió a su visualización al microscopio (x1000 aumentos, Olympus BX-50). Las imágenes, un campo óptico por muestra, se capturaron con una cámara digital Canon EOS-50.

3.4 Evaluación de la adhesión sobre PET, bajo condiciones de estrés salino

Los factores de adhesión de *S. epidermidis*, y por tanto la formación de biopelículas, se estimulan por la presencia de diversos estreses, como puede ser la presencia de NaCl o etanol (Knobloch et al., 2001). A fin de comprobar si este era el caso en nuestras cepas clínicas realizamos un experimento de adhesión bajo estrés salino tal y como se describe en (Hulander et al., 2019).

Las bacterias se preinocularon en matraces Erlenmeyer (250 ml) conteniendo 25 ml de caldo nutritivo, incubándose a 37°C, 90 rpm durante 24 h. Después de 24h de incubación, el cultivo se refresca traspasando 20 ml del pre-inóculo a un nuevo matraz Erlenmeyer con 25 ml de caldo nutritivo fresco y se incuba a 37°C, 90 rpm durante 2 h. De este último cultivo se tomó una alícuota de 10 ml de la suspensión bacteriana y se descartó el medio de cultivo por centrifugación (4000 rpm, 5 min). Los precipitados de células resultantes se lavaron 3 veces

en agua estéril (control) o solución salina (1% NaCl). Los precipitados lavados se resuspendieron en las soluciones control y salina hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm (Espectrofotómetro Beckman DU-800). En paralelo, se cuantificó el número de células en suspensión empleando una cámara de Burker, obteniéndose una concentración de 2×10^8 bacterias/ml. De las suspensiones de bacterias obtenidas se depositaron 100 μ l sobre de láminas de PET y, a fin de permitir la adhesión, se incubaron a 37°C durante 2h, dentro de una placa de Petri. Los ensayos se realizaron por triplicado (n=3). Tras la incubación, los plásticos se lavaron tres veces con abundante agua, se depositaron sobre un portaobjetos, las bacterias se tiñeron con cristal violeta, se observaron al microscopio y se capturaron las imágenes representativas de al menos 3 campos ópticos diferentes, como se describió anteriormente en el apartado 2.3. Las imágenes resultantes se procesaron con el software ImageJ (Versión 1.54) a fin de determinar el % de área cubierta por células. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el software GraphPad Prism (Versión 8.0.2), brevemente, se evaluó la normalidad de los datos y se aplicó en consecuencia un test no paramétrico (Test Brown-Forsthye y Welch-ANOVA).

3.5 Evaluación de la adhesión sobre PET saturado de proteínas del suero

Los insertos médicos están expuestos a los fluidos corporales, como por ejemplo la sangre. Existen numerosas evidencias que demuestran como el recubrimiento de las proteínas del suero de los plásticos pueden afectar a la adhesión de las bacterias formadoras de biopelículas (Badihi Hauslich et al., 2013). Con el objetivo de estudiar el efecto de las proteínas sobre la adhesión de las bacterias, se llevó a cabo un ensayo en el que se utilizó suero bovino fetal (FBS) para recubrir la superficie de PET.

El procedimiento general del experimento fue similar al descrito en el apartado 2.4, con la salvedad del pretratamiento del PET (piezas de 2x2 cm) con FBS. Los cuadrados de plástico esterilizado por inmersión en alcohol se incubaron en FBS al 1%, en una placa de Petri a 28°C, durante 24 h. Los plásticos control o recubiertos con proteínas séricas se lavaron extensivamente con agua estéril y se procedió a la incubación con las bacterias en solución salina. Las condiciones experimentales se realizaron por triplicado (n=3) y se adquirieron tres campos ópticos por muestra para su cuantificación y análisis estadístico.

3.6 Evaluación de la adhesión sobre diferentes materiales plásticos

La adhesión de las bacterias se ve afectada por las características físico-químicas de la superficie y por tanto de su composición (Valentin et al., 2019). En los hospitales se emplean gran diversidad de materiales plásticos que pueden presentar diferente susceptibilidad a formar biopelículas. En el siguiente ensayo evaluaremos la adhesión de las 3 bacterias en estudio sobre diferentes tipos de plástico empleados en clínica. Empleamos 4 tipos plástico: polietileno tereftalato (PET), polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad (LDPE) y poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV, PHB 92% y PHV 8%). Los plásticos LDPE y HDPE son polímeros de cadena larga derivados de etileno, ambos son ampliamente empleados en la industria del envasado debido a sus características como son: su ligereza, bajo coste, durabilidad, eficiencia energética y facilidad de procesamiento (Ojha et al., 2017). La principal diferencia entre ambos tipos de plástico son las ramificaciones de las cadenas laterales, el LDPE presenta un alto grado de ramificación mientras que el HDPE es prácticamente lineal, con un bajo grado de ramificación. Dadas estas estructuras el LDPE tiene baja cristalinidad y densidad, al contrario que el HDPE, que tiene una elevada cristalinidad y densidad. Estas diferencias provocan que el HDPE tenga una superficie más dura y que el LDPE sea más flexible (Hu et al., 2021). El PHBV es un plástico perteneciente a la familia de los polihidroxicanoatos (PHA), esta familia de materiales destaca por ser biodegradable y biocompatible, haciéndolos interesantes para las ciencias biomédicas. Se utilizan para restaurar el volumen y funcionalidad de tejido dañado, actuando como andamios que sujetan el tejido mientras cicatriza (Chaber et al., 2022).

En este experimento se procedió de igual forma que en el apartado 2.4. Brevemente, tras cortar los trozos de 2x2 cm de todos los tipos de plástico, se desinfectaron en un baño de alcohol 75°, se incubaron las bacterias en solución control y salina (37°C, 2h), lavaron, tiñeron con safranina y capturaron las imágenes para su cuantificación. Las condiciones experimentales se repitieron tres veces (n=3) y se capturaron 3 campos ópticos diferentes por condición.

4. Resultados

4.1 Pureza de las cepas

En el presente estudio se emplearon dos cepas de *S. epidermidis* (6924-20 y 2037-25) aisladas de pacientes ingresados en el Hospital de la Candelaria. La cepa 6924-20 fue aislada de un hemocultivo y la cepa 2037-25, de un catéter contaminado. Ambas presentaron resistencia a múltiples antibióticos. La tinción de Gram mostró que se tratan de cocos Gram positivos agrupados en racimos (Figura 4).

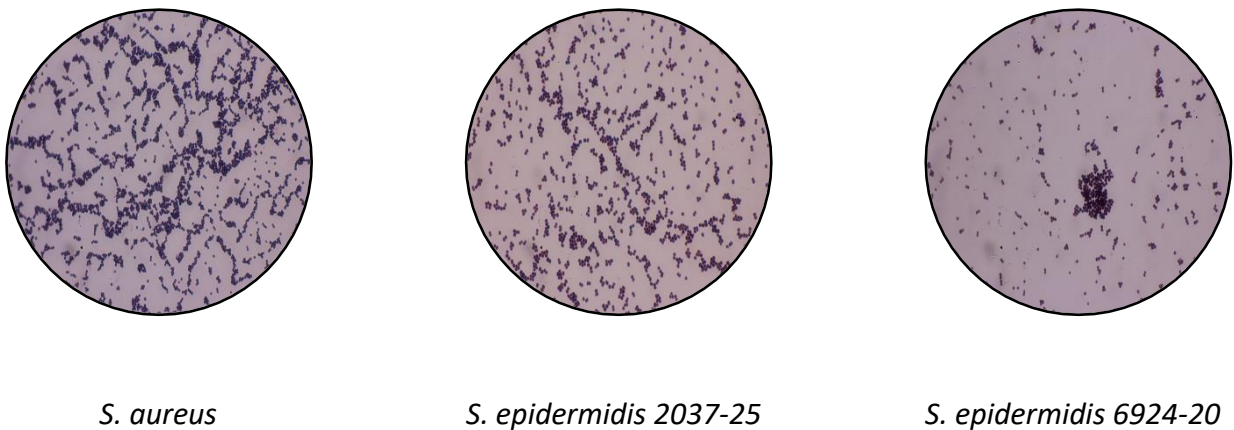


Figura 4. Tinción de Gram. Imágenes representativas de la cepa tipo *Staphylococcus aureus* y las cepas clínicas de *S. epidermidis*. Las imágenes están tomadas con una magnificación de x1000 aumentos.

Los resultados de las pruebas realizadas (Tabla 1) coinciden con lo esperado para el género y las especies, lo que, junto a la tinción de Gram, indica que se trata de aislados puros.

Tabla 1. Características fenotípicas de las bacterias utilizadas en el estudio.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i> 2037-25	<i>S. epidermidis</i> 6924-20
Morfología	Cocos	Cocos	Cocos
Gram	+	+	+
Agrupamiento	Racimo	Racimo	Racimo
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
Coagulasa	+	-	-
DNasa	+	-	-
Fermentación de manitol	+	-	-
Hemólisis	β	β (débil)	γ

4.2 Evaluación de la adhesión sobre PET, bajo condiciones de estrés salino

Uno de los factores que estimula la adhesión de *S. epidermidis* a las superficies son las condiciones de estrés, como por ejemplo la presencia de NaCl (Hulander et al., 2019). En este sentido, algunos dispositivos médicos, como los catéteres venosos centrales, se rellenan de soluciones antisépticas (Ej: 2% clorhexidina) provocando condiciones de estrés sobre las posibles bacterias contaminantes. A fin de investigar la capacidad de adhesión bajo estrés salino de las cepas clínicas de *S. epidermidis*, realizamos un ensayo de adhesión sobre PET en ausencia y presencia de 1% de NaCl. Observamos que las tres bacterias ensayadas incrementan significativamente la adhesión al PET en la condición salina respecto al control, destacando las cepas de *S. epidermidis* sobre *S. aureus* (Figura 5).

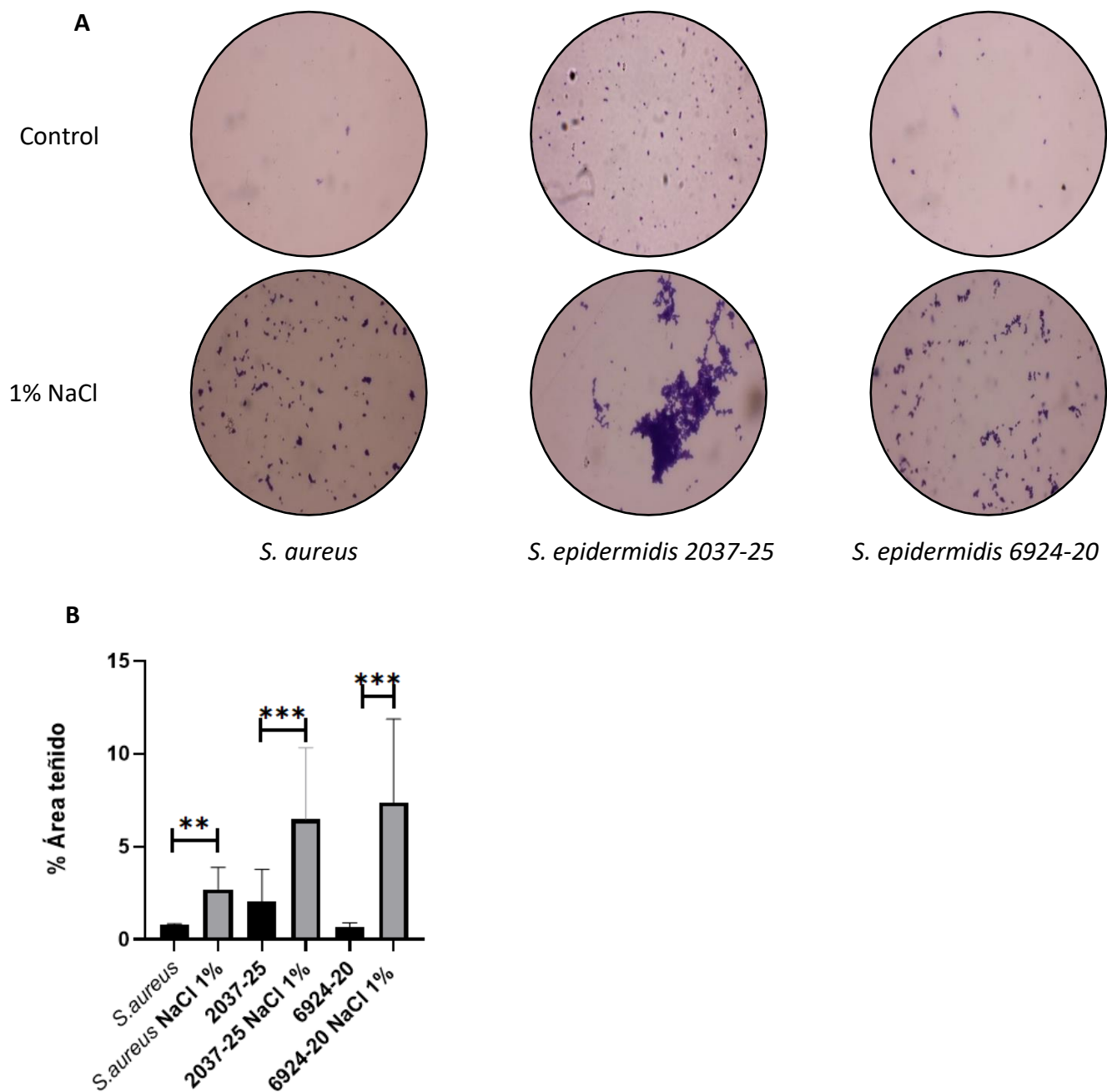


Figura 5. Evaluación de la adhesión bajo condiciones de estrés salino. A) Imágenes representativas (1000 aumentos) de las bacterias adheridas a la superficie de una lámina de plástico de polietileno tereftalato (PET) en ausencia (Control) o presencia de estrés salino (1% NaCl). Las células se tiñeron con cristal violeta para su visualización. Cada condición experimental se realizó por triplicado (N=3) y se capturaron 3 campos ópticos diferentes por condición (n=3). **B)** Histograma correspondiente a la cuantificación del % de área teñida (N=3 y n=3), realizada con el software ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Las condiciones significativamente diferentes se señalan con una barra donde: ** corresponde a $p \leq 0,01$ y *** a $p \leq 0,001$.

4.3 Evaluación de la adhesión sobre PET saturado de proteínas del suero

El instrumental sanitario plástico en contacto con la sangre del paciente se recubre de proteínas del plasma, afectando a la capacidad de adhesión de las bacterias a su superficie (Badihi Hauslich et al., 2013). Las cepas clínicas de *S. epidermidis*, al igual que *S. aureus*, redujeron significativamente su capacidad de adhesión, bajo condiciones de estrés salino, cuando las láminas de PET se recubrieron de proteínas del suero bovino fetal (FBS), en comparación con las no tratadas (Figura 6).

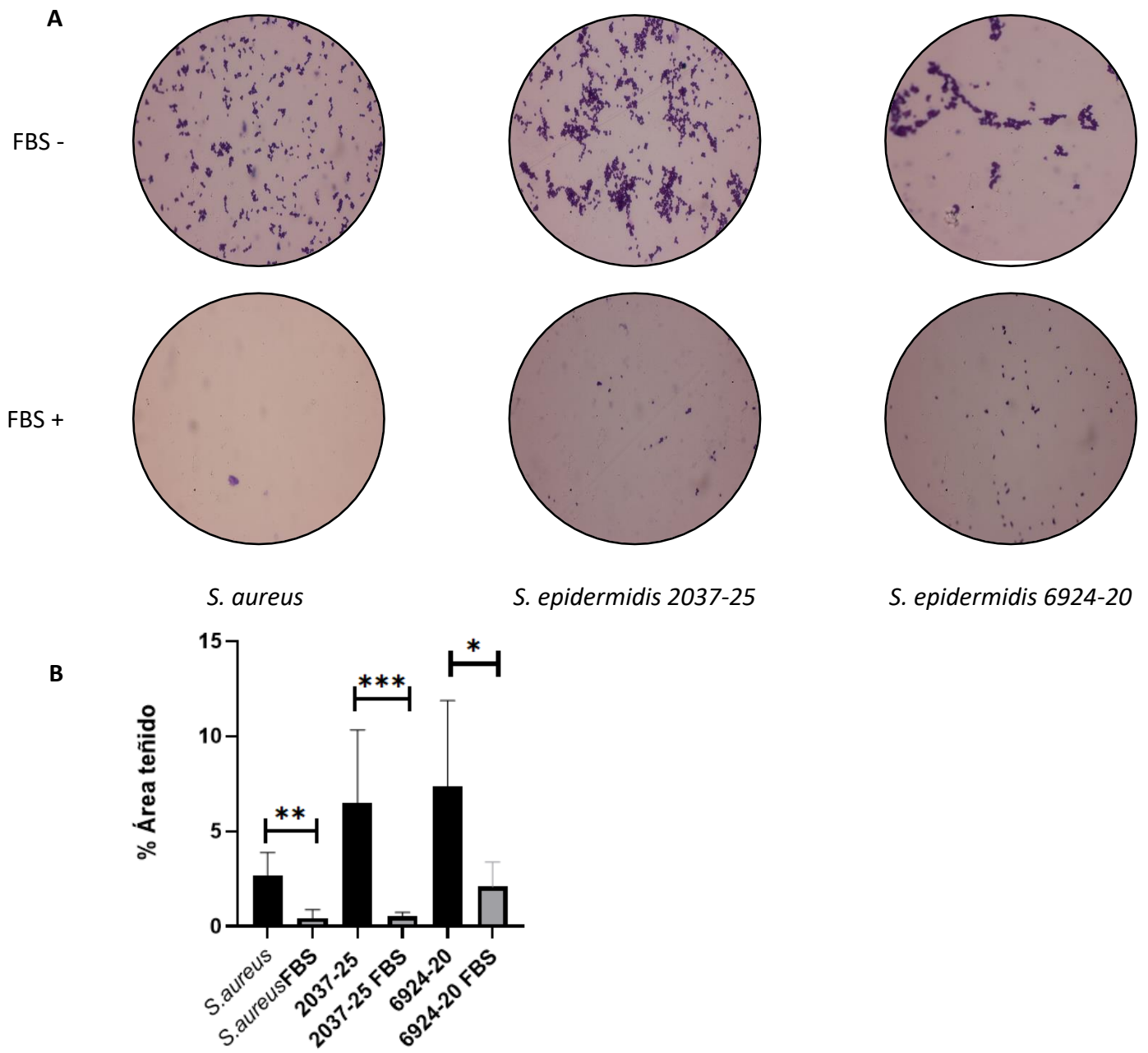


Figura 6. Evaluación de la adhesión en superficies adsorbidas con proteínas del suero. A) Imágenes representativas (x1000 aumentos) de las bacterias adheridas a la superficie de una lámina de plástico de polietileno tereftalato (PET) sin tratamiento (FBS -) o tratado con proteínas de suero bovino fetal (FBS+). Las células se tiñeron con cristal violeta para su visualización. Cada condición experimental se realizó por triplicado (n=3) y se capturaron 3 campos ópticos diferentes por condición. **B)** Histograma correspondiente a la cuantificación del % de área teñida (N=3 y n=3), realizada con el software ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Las condiciones significativamente diferentes se señalan con una barra donde: * corresponde a $p \leq 0,05$; ** a $p \leq 0,01$ y *** a $p \leq 0,001$.

4.4 Evaluación de la adhesión sobre diferentes materiales plásticos

La capacidad de adhesión de las bacterias es diferente dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los materiales sobre los que se adhieren (composición química, hidrofobicidad, carga, rugosidad de la superficie y la topografía; Valentin et al., 2019). Dependiendo de la especie o incluso la cepa, los diferentes tipos de materiales plásticos pueden favorecer o inhibir la adhesión bacteriana. En el caso de *S. aureus* no observamos diferencias significativas entre los 4 materiales empleados. En contraste, la adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis* varió dependiendo del tipo de plástico. La cepa 2037-25 se adhiere significativamente más al LDPE, respecto a los otros materiales utilizados. Para el caso de la cepa 6924-20, esta se adhiere significativamente más en los plásticos compuestos de HDPE, LDPE y PHBV, comparado con la cuantificada para el PET.

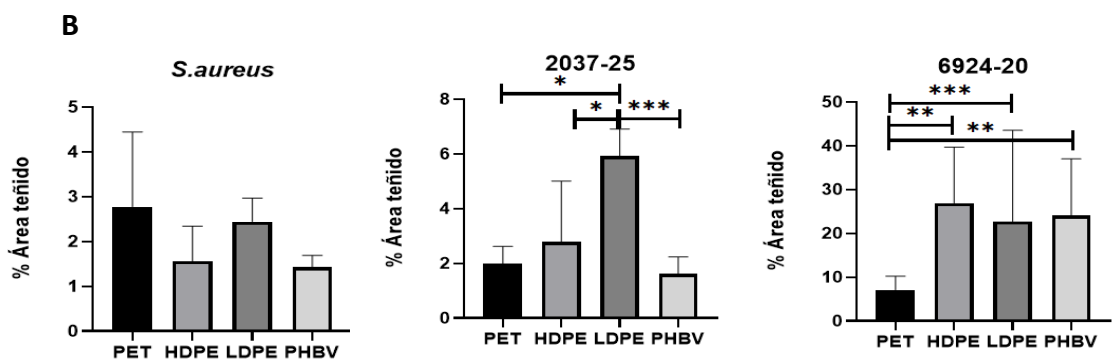
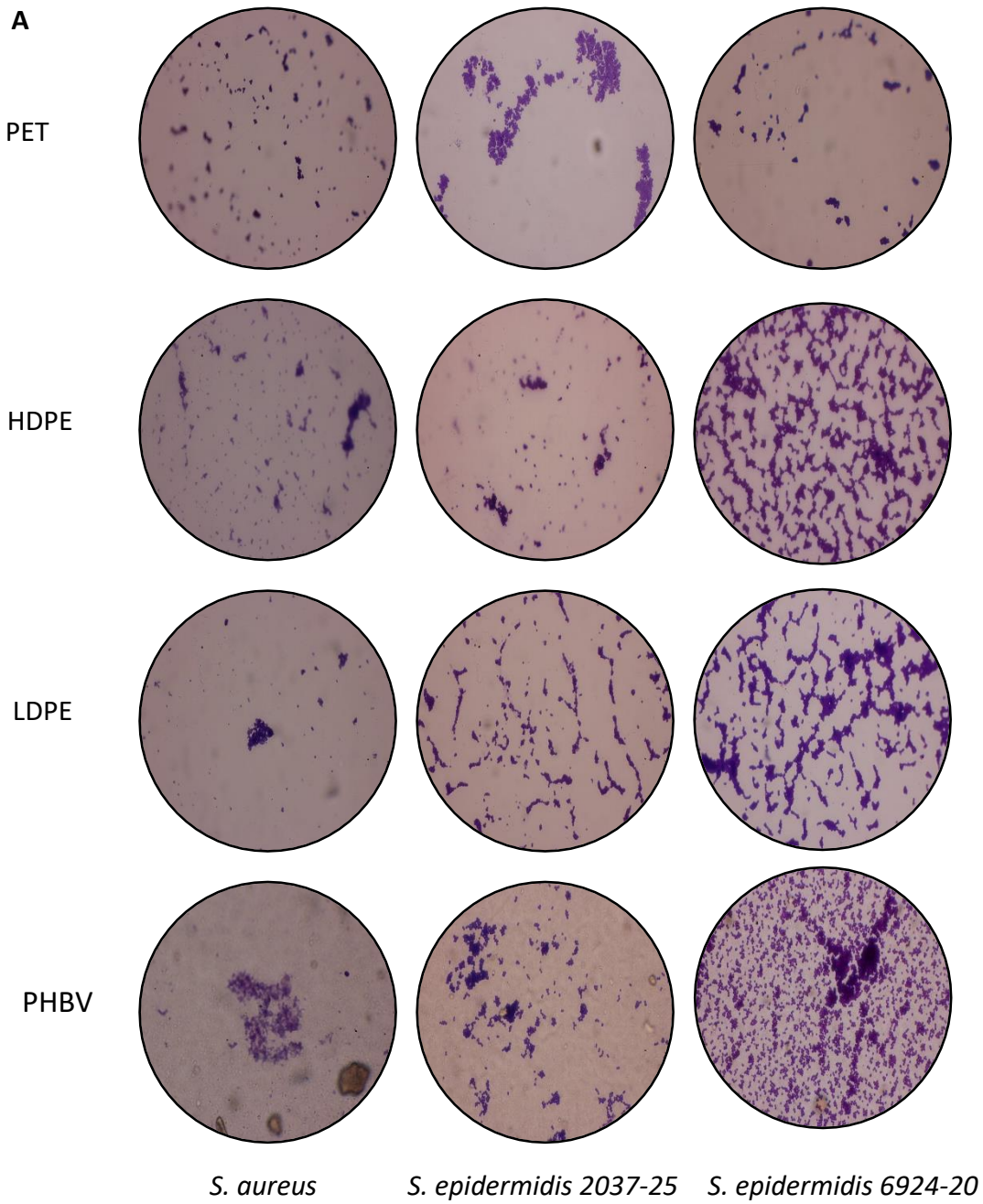


Figura 7. Evaluación de la adhesión sobre diferentes materiales plásticos. A) Imágenes representativas (1000 aumentos) de las bacterias adheridas a la superficie de láminas de polietileno tereftalato (PET), polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad (LDPE) y poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV). Las células se tiñeron con cristal violeta para su visualización. Cada condición experimental se realizó por triplicado (N=3) y al menos se capturaron 3 campos ópticos diferentes por condición (n=3). B: Histograma correspondiente a la cuantificación del % de área teñida (N=3 y n≥3), realizada con el software ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar. Las condiciones significativamente diferentes se señalan con una barra donde: * corresponde a $p \leq 0,5$, ** corresponde a $p \leq 0,01$ y *** a $p \leq 0,001$.

5. Discusión

S. epidermidis es una bacteria comensal presente en la piel humana que, debido a su abundancia y su habilidad para formar biopelículas, supone un riesgo de contaminación de los implantes médicos de los pacientes (Moris et al., 2022). Tanto *S. epidermidis* como *S. aureus* son bacterias comensales con capacidad de ser patógenas, siendo un factor de virulencia su capacidad para adherirse a las superficies y formar biopelículas (Trobos et al., 2022).

Eliminar las infecciones nosocomiales, derivadas de las biopelículas, implica emplear agresivos tratamientos antibióticos y retirar los implantes médicos contaminados, con las consecuencias que conlleva para el cuidado óptimo del paciente. Esta situación puede ser aún de peor pronóstico para el paciente cuando, en ocasiones, se combina con un delicado estado de salud y la presencia de factores de resistencia bacteriana a los tratamientos (Fišarová et al., 2021). Las cepas clínicas de *S. epidermidis* ensayadas fueron aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales y presentaron resistencia a múltiples antibióticos. Una vez aisladas fueron conservadas, por varios años, en crioviales hasta su uso en el presente trabajo. Ambas cepas respondieron como cabría esperar a las pruebas básicas de confirmación realizadas, concluyendo que están ausentes de contaminación.

La inhibición de la formación de las biopelículas se considera una de las dianas para prevenir la contaminación del instrumental médico y, por tanto, las infecciones nosocomiales (Roy et al., 2017). Por ello, entender los mecanismos moleculares de la formación de las biopelículas en sus estadios iniciales y los factores que las regulan es fundamental para el diseño de dianas terapéuticas. La adhesión a superficies de *S. epidermidis* es regulada por múltiples factores, como la glucosa y diversos estímulos de estrés como la presencia de NaCl

y etanol (Cue et al., 2012). Las cepas clínicas investigadas, al igual que *S. aureus*, presentaron mayor adhesión sobre el PET bajo condiciones de estrés salino. Una explicación para nuestra observación puede ser que el estrés salino, en *S. epidermidis*, active la síntesis de la adhesina intercelular de polisacárido (PIA), dependiente del gen *rsbU*, incrementando por tanto la adhesión (Knobloch et al., 2001). El gen *rsbU* es un regulador positivo del factor sigma B, integrante general de la respuesta a estrés de los microorganismos Gram positivos. Aunque este no es el único mecanismo, pues se sabe que al menos existen otras dos posibles rutas mediante factores desconocidos o incluso regulando la transcripción del operón *icaABCD*, responsable de la síntesis del PIA (Gomes et al., 2011). Mecanismos similares se han descrito en *S. aureus*, donde el estrés salino activa el operón *icaABCD* aumentando la adhesión (Lade et al., 2019). Aunque no existe estrés salino de forma continua en los implantes, sí que estos están sometidos, por ejemplo, en los catéteres, a soluciones antisépticas (Ej: 2% Clorhexidina) que sí pueden desencadenar la respuesta a estrés bacteriana y estimular la adhesión. En este sentido, sería interesante investigar la habilidad de diferentes sustancias estresantes para iniciar la respuesta a estrés bacteriana y estimular su adhesión.

La superficie de los implantes médicos se encuentra en contacto con los tejidos y fluidos del paciente, lo que inevitablemente los recubre de proteínas y otras moléculas presentes en el organismo (lípidos, azúcares, etc.) alterando sus cualidades iniciales. Este recubrimiento de las superficies afecta a la adhesión bacteriana positiva o negativamente, dependiendo del microorganismo. Por ejemplo, *S. aureus* puede unirse al fibrinógeno a través de la proteína de membrana de von Willebrand (también conocido como falsa coagulasa) y, junto a la actividad libre de la coagulasa, formar polímeros de fibrina. Con estas actividades forma una pseudocápsula a su alrededor que le ayuda a evadir la respuesta inmune del hospedador (Thomas et al., 2019). Esta misma actividad hace que incremente su adhesión a superficies cubiertas de fibrinógeno e incrementa su capacidad para formar biopelículas. En contraste, *S. epidermidis* carece de estas actividades coagulasa y, por tanto, las superficies cubiertas de fibrinógeno inhiben su adhesión a las superficies (Linnes et al., 2012). Nuestros resultados muestran que el recubrimiento del PET, con los componentes del suero inhibe la adhesión de las tres bacterias, bajo condiciones de estrés salino. Esto puede ser debido a que el suero está constituido por proteínas como la albúmina, hormonas, insulina, etc. (Lee et al., 2022) pero, a diferencia del plasma, no posee los factores de coagulación, entre los que se encuentra el fibrinógeno. Al no haber fibrinógeno en la superficie, el mecanismo específico de adhesión de

S. aureus no es funcional. Además, otros factores físicos como la hidrofobicidad, carga, rugosidad, topografía de la superficie, etc. sí se pueden ver alterados por la adsorción de los componentes del suero, afectando negativamente la adhesión de las bacterias estudiadas (Valentin et al., 2019).

La diversidad de materiales, empleados en la fabricación de implantes médicos, es enorme (Cohen et al., 2011), incrementando con ello la variabilidad en la capacidad de adhesión de las cepas bacterianas a su superficie y, por tanto, incrementando igualmente la dificultad para prevenir su contaminación con terapias únicas. Nuestros resultados muestran diferentes grados de adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis*, dependiendo del material empleado. La especificidad de adhesión, dependiente del material plástico, sugiere que ambas cepas de *S. epidermidis* activan diferentes factores de adhesión, bajo el estrés salino.

Dada la gran multitud de factores que afectan a la adhesión bacteriana y, por tanto, a la contaminación de los implantes, es difícil predecir factores de adhesión únicos que resulten ser dianas terapéuticas eficaces. Sin embargo, la respuesta bacteriana al estrés salino, y posiblemente otros tipos de estrés, si parecen desembocar en un resultado común, el incremento de la adhesión a las superficies plásticas. Por tanto, interferir la respuesta bacteriana al estrés es una potencial diana terapéutica a investigar en más profundidad. Con ello podríamos lograr interferir la adhesión a las superficies de los implantes y su contaminación eliminando así todas las complicaciones derivadas sobre los pacientes y el sistema de salud.

6. Conclusiones

- 1) Las cepas clínicas de *S. epidermidis* 2037-25 y 6924-20 responden a la caracterización fenotípica esperada, confirmando que son cepas puras.
- 2) Las cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* incrementan la adhesión a la superficie del PET bajo condiciones de estrés salino.
- 3) Las cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* disminuyen la adhesión a la superficie del PET recubierta por proteínas del suero fetal bovino, bajo condiciones de estrés salino.
- 4) *S. aureus* mostró niveles de adhesión similares sobre las diferentes superficies plásticas ensayadas (PET, HDPE, LDPE y PHBV).

- 5) La cepa de *S. epidermidis* 2037-25 se adhiere con mayor intensidad al LDPE, comparado con el resto de los plásticos ensayados (PET, HDPE y PHBV).
- 6) La cepa de *S. epidermidis* 6924-20 se adhiere con menor intensidad al PET, comparado con el resto de los plásticos ensayados (HDPE, LDPE y PHBV).

Conclusions

- 1) Clinical strains of *S. epidermidis* 2037-25 and 6924-20 respond to the expected phenotypic characterization, confirming that they are pure strains.
- 2) *S. epidermidis* and *S. aureus* strains increase adhesion to the PET surface under salt stress conditions.
- 3) *S. epidermidis* and *S. aureus* strains decrease adhesion to PET surface coated by fetal bovine serum proteins under salt stress conditions.
- 4) *S. aureus* showed similar levels of adhesion on the different plastic surfaces tested (PET, HDPE, LDPE and PHBV).
- 5) *S. epidermidis* strain 2037-25 adheres more intensely to LDPE, compared to the rest of the plastics tested (PET, HDPE and PHBV).
- 6) *S. epidermidis* strain 6924-20 adheres less intensely to PET, compared to the rest of the plastics tested (HDPE, LDPE and PHBV).

7. Limitaciones

Los experimentos evalúan la adhesión de dos cepas clínicas desconocidas de *S. epidermidis*, suponiendo una limitación importante al no conocer previamente su comportamiento esperable. A fin de compararlas con cepas de referencia, de las que sí conocemos su comportamiento, podríamos realizar los experimentos con cepas tipo de *S. epidermidis* capaces de adherirse para formar biopelículas (cepa ATCC35984 (RP62A)) y sin capacidad de adhesión a las superficies (cepa ATCC12228).

Los experimentos se han realizado con únicamente dos cepas clínicas de *S. epidermidis*, a fin de incrementar la representatividad de los resultados respecto a la realidad hospitalaria, sería recomendable incrementar el número de cepas clínicas estudiadas.

Los experimentos realizados con cepas bacterianas desconocidas requieren de mayor número de réplicas que las realizadas en el presente trabajo. Es por esta razón, que los análisis estadísticos pueden verse afectados por la variabilidad y el bajo número de réplicas.

8. Bibliografía

1. Ahmad, S., Rahman, H., Qasim, M., Nawab, J., Alzahrani, K. J., Alsharif, K. F., & Alzahrani, F. M. (2022). Staphylococcus epidermidis Pathogenesis: Interplay of icaADBC Operon and MSCRAMMs in Biofilm Formation of Isolates from Pediatric Bacteremia in Peshawar, Pakistan. *Medicina*, 58(11), 1510. <https://doi.org/10.3390/medicina58111510>
2. Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., & Prévost, G. (2019). Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1215. <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>
3. Badihi Hauslich, L., Sela, M. N., Steinberg, D., Rosen, G., & Kohavi, D. (2013). The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: Role of plasma proteins and electrostatic forces. *Clinical Oral Implants Research*, 24(A100), 49-56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02364.x>
4. Beloin, C., Fernández-Hidalgo, N., & Lebeaux, D. (2017). Understanding biofilm formation in intravascular device-related infections. *Intensive Care Medicine*, 43(3), 443-446. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4480-7>
5. Büttner, H., Mack, D., & Rohde, H. (2015). Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: Mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>
6. Çaykara, T., Sande, M. G., Azoia, N., Rodrigues, L. R., & Silva, C. J. (2020). Exploring the potential of polyethylene terephthalate in the design of antibacterial surfaces. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(3), 363-372. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00660-8>
7. Chaber, P., Tylko, G., Włodarczyk, J., Nitschke, P., Hercog, A., Jurczyk, S., Rech, J., Kubacki, J., & Adamus, G. (2022). Surface Modification of PHBV Fibrous Scaffold via Lithium Borohydride Reduction. *Materials*, 15(21), 7494. <https://doi.org/10.3390/ma15217494>
8. Cohen, A. B., Dagli, M., Stavropoulos, S. W., Mondschein, J. I., Soulen, M. C., Shlansky-Goldberg, R. D., Solomon, J. A., Chittams, J. L., & Trerotola, S. O. (2011). Silicone and Polyurethane Tunneled Infusion Catheters: A Comparison of Durability and Breakage Rates. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 22(5), 638-641. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2011.01.433>
9. Costa, S. K., Cho, J., & Cheung, A. L. (s. f.). GraS Sensory Activity in Staphylococcus epidermidis Is Modulated by the “Guard Loop” of VraG and the ATPase Activity of VraF. *Journal of Bacteriology*, 203(17), e00178-21. <https://doi.org/10.1128/JB.00178-21>

10. Cromwick, M., & Petroff, H. (2020). *Effect of Stiffness and Texturing on Staphylococcus epidermidis Adhesion to Surfaces* [Worcester Polytechnic Institute]. https://digital.wpi.edu/concern/student_works/mc87ps62c?locale=en
11. Cue, D., Lei, M. G., & Lee, C. Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00038>
12. Dong, Y., Speer, C. P., & Glaser, K. (2018). Beyond sepsis: Staphylococcus epidermidis is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*, 9(1), 621-633. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419117>
13. Dréno, B., Dagnelie, M. A., Khammari, A., & Corvec, S. (2020). The Skin Microbiome: A New Actor in Inflammatory Acne. *American Journal of Clinical Dermatology*, 21(1), 18-24. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00531-1>
14. Fišarová, L., Botka, T., Du, X., Mašlačňová, I., Bárđy, P., Pantůček, R., Benešík, M., Roudnický, P., Winstel, V., Larsen, J., Rosenstein, R., Peschel, A., & Doškař, J. (2021). Staphylococcus epidermidis Phages Transduce Antimicrobial Resistance Plasmids and Mobilize Chromosomal Islands. *mSphere*, 6(3), e00223-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00223-21>
15. Foster, T. J. (2020). Surface Proteins of Staphylococcus epidermidis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1829. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01829>
16. Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. *Nature reviews. Microbiology*, 12(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
17. Fournière, M., Latire, T., Souak, D., Feuilloley, M. G. J., & Bedoux, G. (2020). Staphylococcus epidermidis and Cutibacterium acnes: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms*, 8(11), 1752. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111752>
18. Gomes et al. (2011). Virulence Gene Expression by Staphylococcus epidermidis Biofilm Cells Exposed to Antibiotics. *MICROBIAL DRUG RESISTANCE*, 17(2), 191-196. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0149191> brought to you by COREView metadata, citation and similar papers at core.ac.uk provided by Universidade do Minho: RepositoriUM
19. Guo, Y., Ding, Y., Liu, L., Shen, X., Hao, Z., Duan, J., Jin, Y., Chen, Z., & Yu, F. (2019). Antimicrobial susceptibility, virulence determinants profiles and molecular characteristics of Staphylococcus epidermidis isolates in Wenzhou, eastern China. *BMC Microbiology*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1523-6>
20. Hirose, M., Aung, M. S., Fujita, Y., Kato, T., Hirose, Y., Yahata, S., Fukuda, A., Saitoh, M., Urushibara, N., & Kobayashi, N. (2022). Genetic Characterization of Staphylococcus aureus, Staphylococcus argenteus, and Coagulase-Negative Staphylococci Colonizing Oral Cavity and Hand of Healthy Adults in Northern Japan. *Pathogens*, 11(8), 849. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080849>

21. Hu, E., Yuan, H., Du, Y., & Chen, X. (2021). LDPE and HDPE Microplastics Differently Affect the Transport of Tetracycline in Saturated Porous Media. *Materials*, 14(7), 1757. <https://doi.org/10.3390/ma14071757>
22. Hulander, M., Valen-Rukke, H., Sundell, G., & Andersson, M. (2019). Influence of Fibrinogen on Staphylococcus epidermidis Adhesion Can Be Reversed by Tuning Surface Nanotopography. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(9), 4323-4330. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00450>
23. Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>
24. Knobloch, J. K.-M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.-H., & Mack, D. (2001). Biofilm Formation by Staphylococcus epidermidis Depends on Functional RsbU, an Activator of the sigB Operon: Differential Activation Mechanisms Due to Ethanol and Salt Stress. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2624-2633. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2624-2633.2001>
25. Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J.-M., Joo, H.-S., & Kim, J.-S. (2019). Biofilm Formation by Staphylococcus aureus Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1853. <https://doi.org/10.3390/jcm8111853>
26. Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., Choi, J. S., Kim, G.-D., Joo, S. T., Choi, I., & Hur, S. J. (2022). Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Science of Animal Resources*, 42(5), 775. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>
27. Leong, J. Y., Capella, C. E., D'Amico, M. J., Isguven, S., Purtill, C., Machado, P., Delaney, L. J., Henry, G. D., Hickok, N. J., Forsberg, F., & Chung, P. H. (2022). A scoping review of penile implant biofilms—What do we know and what remains unknown? *Translational Andrology and Urology*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.21037/tau-22-195>
28. Linnes, J. C., Mikhova, K., & Bryers, J. D. (2012). Adhesion of Staphylococcus epidermidis to biomaterials is inhibited by fibronectin and albumin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(8), 1990-1997. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34036>
29. Moris, V., Lam, M., Amoureux, L., Magallon, A., Guilloteau, A., Maldiney, T., Zwetyenga, N., Falentin-Daudre, C., & Neuwirth, C. (2022). What is the best technic to dislodge Staphylococcus epidermidis biofilm on medical implants? *BMC Microbiology*, 22, 192. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02606-x>
30. Namvar, A. E., Bastarahang, S., Abbasi, N., Ghehi, G. S., Farhadbakhtiarian, S., Arezi, P., Hosseini, M., Baravati, S. Z., Jokar, Z., & Chermahin, S. G. (2014). Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: A systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control*, 9(3), Doc23. <https://doi.org/10.3205/dgkh000243>

31. Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V., & Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, 7, 39515. <https://doi.org/10.1038/srep39515>
32. Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis—The «accidental» pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
33. Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015>
34. Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2017). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522-554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
35. Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 84(3), e00026-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>
36. Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
37. Severn, M. M., & Horswill, A. R. (2023). Staphylococcus epidermidis and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00780-3>
38. Stone, L. (2020). The stability of mutualism. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16474-4>
39. Thomas et al. (2019). The Complex Fibrinogen Interactions of the Staphylococcus aureus Coagulases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 106. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00106>
40. Trobos, M., Firdaus, R., Svensson Malchau, K., Tillander, J., Arnellos, D., Rolfson, O., Thomsen, P., & Lasa, I. (2022). Genomics of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis from Periprosthetic Joint Infections and Correlation to Clinical Outcome. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02181-21>
41. Valentin, J. D. P., Qin, X.-H., Fessele, C., Straub, H., van der Mei, H. C., Buhmann, M. T., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2019). Substrate viscosity plays an important role in bacterial adhesion under fluid flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, 552, 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.05.043>