

**Estudio de la adhesión de
Staphylococcus epidermidis
dependiente de glucosa**

**Study of glucose-dependent
adhesion of *Staphylococcus*
*epidermidis***

Trabajo de Fin de Grado

Alejandro Álamo Peña

Tutorizado por Juan R. Hernández Fernaud y Ana M. Rodríguez Pérez

Grado en Biología. Junio 2023

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract.....	4
Palabras clave	5
Key Words.....	5
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Las biopelículas.....	5
1.2. Composición de la matriz extracelular de las biopelículas.	7
1.3. Las biopelículas en el ámbito sanitario	7
1.4. Microorganismos formadores de biopelículas en dispositivos médicos	8
1.5. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1. Medios de cultivo	10
3.2. Cepas bacterianas.....	11
3.3. Mantenimiento de las cepas.	11
3.4. Formación de biopelículas dependientes de glucosa en la interfase líquido- aire.....	12
3.5. Capacidad de adhesión sobre plástico de PET, dependiente de glucosa.	12
3.6. Capacidad de adhesión sobre plástico de poliestireno, dependiente de glucosa.....	13
3.7. Determinación de la producción de la PIA por microscopía.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Capacidad de <i>S. epidermidis</i> de formar biopelículas dependientes de glucosa.	15
4.2. Capacidad de adhesión de <i>S. epidermidis</i> sobre superficies plásticas.....	16
4.2.1. Adhesión sobre material plástico de PET.	16
4.2.2. Adhesión a material plástico de poliestireno.	16
4.3. Producción de la PIA dependiente de glucosa.	18



5.	DISCUSIÓN	22
6.	Conclusiones	24
	Conclusions	25
7.	Limitaciones	25
8.	Bibliografía	26



Resumen

Staphylococcus epidermidis es una bacteria comensal de la microbiota de la piel humana, donde mantiene la homeostasis y evita que otros patógenos puedan instalarse. Sin embargo, bajo determinadas condiciones también se considera un patógeno oportunista y, junto con *Staphylococcus aureus*, es responsable de gran parte de las infecciones nosocomiales. Estas infecciones normalmente son debidas a su habilidad para colonizar la superficie del material sanitario y formar biopelículas. Entre los principales factores de virulencia de estas comunidades organizadas de bacterias encontramos la matriz extracelular, en la que se encuentran envueltas. *S. epidermidis* posee como principal componente de su matriz la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA) que proporciona ventajas a la biopelícula, destacando la adhesión y la resistencia a antibióticos. La síntesis de esta adhesina depende del locus *ica*, cuya expresión es regulada por múltiples factores moleculares entre los que encontramos la glucosa. En este estudio empleamos dos cepas clínicas, aisladas de pacientes, de *Staphylococcus epidermidis* (cepas 2037-35 y 6924-20), para evaluar su capacidad de adhesión y formación de la PIA dependiente de glucosa. Observamos que la adhesión de las cepas clínicas ensayadas se incrementa en presencia de glucosa y es dependiente del método y el material de la superficie empleado. Sin embargo, no detectamos variaciones en la producción de la PIA por microscopía, lo que sugiere que las cepas clínicas de *S. epidermidis* podrían tener mecanismos de adhesión, estimulados por glucosa, independientes de la síntesis de la PIA.

Abstract

Staphylococcus epidermidis is a commensal bacterium of the human skin microbiota where it maintains homeostasis and prevents other pathogens from settling. However, under certain conditions, it is also considered an opportunistic pathogen and, together with *Staphylococcus aureus*, is responsible for most nosocomial infections. These infections are usually due to their ability to colonize the surface of sanitary material and form biofilms. These organized communities of bacteria are covered by an extracellular matrix which is a virulence factor. The intercellular polysaccharide adhesin (PIA) is the main component of the extracellular matrix of *S. epidermidis*, which provides



advantages to the biofilm, highlighting the adhesion and resistance to antibiotics. The synthesis of the PIA depends on the expression of the locus *ica* and is regulated by multiple molecular factors including glucose. In this study, we used two clinical strains of *Staphylococcus epidermidis* (strains 2037-35 and 6924-20), isolated from patients, to evaluate its adhesion capacity and glucose-dependent PIA formation. We observed that the adhesion of the clinical strains tested increases in the presence of glucose and is dependent on the method and surface material used. However, we did not detect variations in PIA production by microscopy, suggesting that clinical strains of *S. epidermidis* may have glucose-stimulated adhesion mechanisms independent of PIA synthesis.

Palabras clave

Staphylococcus epidermidis, PIA, glucosa, biopelícula, adhesión.

Key Words

Staphylococcus epidermidis, PIA, glucose, biofilm, adhesion.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias fueron la primera forma de vida en la Tierra y han logrado persistir hasta el día de hoy, por tanto, es lógico pensar que poseen adaptaciones para sobrevivir en cualquier medio que sea capaz de albergar vida. De hecho, podemos encontrar bacterias en la mayoría de las superficies del planeta, aprovechando una de sus singularidades, la capacidad de formar comunidades organizadas sobre todo tipo de sustratos, lo que les confiere un alto grado de resistencia frente a condiciones adversas. En su conjunto, a estos agregados de bacterias capaces de adherirse a una superficie y crear una comunidad organizada embebida en una matriz se les llama biopelículas o biofilms (Dos Santos et al., 2018).

1.1. Las biopelículas

Las biopelículas se encuentran en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos, salvo en océanos abisales y aguas subterráneas profundas. Normalmente, las bacterias no tienen

preferencia de adhesión por superficies rugosas o lisas y las características físicas de la superficie apenas influyen en la adhesión (Scheeren Brum et al., 2021). Sin embargo, sí tienden a formarse en entornos con alto nivel de cizallamiento, en los que la resistencia a la tracción es grande y no se rompen con facilidad (Donlan & Costerton, 2002).

En el desarrollo de las biopelículas se pueden distinguir varias etapas, empezando por la colonización de la superficie por la adhesión de las bacterias al sustrato y una posterior proliferación activa (Figura 1). A continuación, las bacterias producen matriz extracelular en grandes cantidades, lo que favorece la agregación de las células y la formación de microcolonias. En la fase de maduración, estas aumentan de tamaño, dando lugar a macrocolonias conectadas por canales rellenos de medio líquido (Tenorio et al., 2003). Estas formaciones complejas pueden estar constituidas incluso por diferentes especies de microorganismos. En este entorno las bacterias se encuentran íntimamente conectadas, lo que facilita la comunicación entre los distintos grupos de células y el intercambio de material genético. En la última etapa, o fase de dispersión, grupos de microorganismos se desprenden del conjunto original y se diseminan para colonizar otras áreas (Figura 1).

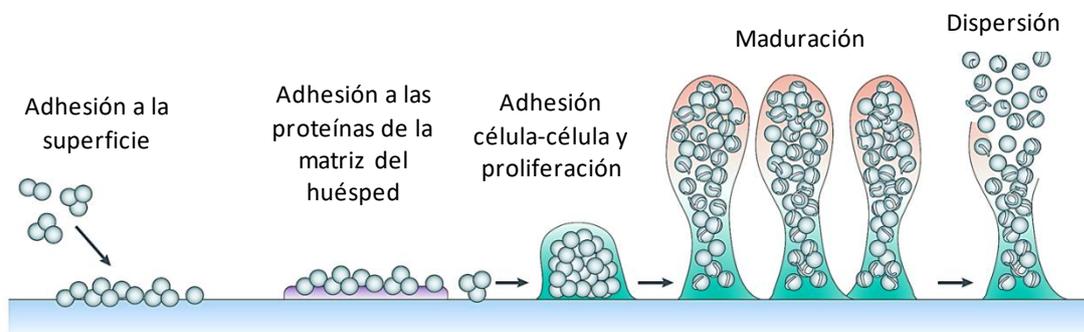


Figura 1. Fases de formación de la biopelícula. Extraído de Otto, 2009.

Las bacterias que conforman una biopelícula poseen una serie de ventajas frente a las bacterias de vida libre. Al encontrarse formando una comunidad inmersa en la misma matriz, se facilita: la comunicación intercelular mediante el mecanismo de percepción de quorum (quorum sensing), el intercambio de metabolitos, la adhesión al sustrato y, especialmente, la protección y resistencia a fuerzas de cizallamiento, fármacos y otros compuestos tóxicos, el sistema inmune del hospedador (en el caso de bacterias



patógenas) y diferentes factores ambientales adversos como la deshidratación o los rayos UV (Dos Santos et al., 2018).

1.2. Composición de la matriz extracelular de las biopelículas.

La matriz extracelular de las biopelículas está compuesta por un conglomerado de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Entre sus componentes encontramos polisacáridos, proteínas y ADN que favorecen la agregación de las bacterias, permitiendo el establecimiento de interacciones célula-célula. Un elemento importante de las EPS es la adhesina intercelular de polisacáridos o PIA (Flemming & Wingender, 2010). Se trata un homopolímero de residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con enlace β -1 \rightarrow 6 cuya ruta de biosíntesis está localizada en el locus *ica*, que incluye el gen *icaR* y el operón *icaADBC*. Los genes del operón codifican las proteínas transmembrana que transportan los oligómeros de N-acetil-glucosamina y las encargadas de desacetilar dichos oligómeros una vez secretados. Este último paso es crucial para las diversas funciones que cumple la PIA: la formación de la biopelícula, la resistencia a péptidos antimicrobianos y la fagocitosis por neutrófilos. Además, el carácter catiónico que adquiere el polímero, facilita las interacciones electrostáticas con otras moléculas extracelulares y las propiedades adhesivas de la matriz (Schulze et al., 2021). Un inhibidor de la síntesis de la PIA es el gen *icaR* que inhibe la expresión del operón *icaADBC*. El gen *icaR* se silencia durante la etapa de crecimiento de la biopelícula, permitiendo la síntesis y deposición de la PIA, pero en la fase estacionaria se activa para detenerla (Conlon et al., 2002; Dobinsky et al., 2003; Nguyen et al., 2020). La PIA es un factor que podemos encontrar con frecuencia en patógenos nosocomiales como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, *S. epidermidis* puede producir biopelículas independientes de la PIA, formando una matriz basada en proteínas, independiente del locus *ica*, (Severn & Horswill, 2023). Esta situación se ha encontrado en al menos el 50% de los aislados de biopelículas de *S. epidermidis* en superficies con alto cizallamiento (Schaeffer et al., 2016).

1.3. Las biopelículas en el ámbito sanitario

La formación de biopelículas en el ámbito hospitalario son el origen de numerosas bacteriemias, causando graves problemas de salud al paciente y al sistema sanitario,



consumiendo sus recursos. De hecho, las evidencias muestran que las bacterias patógenas en forma de biopelículas son capaces de infectar al hospedador con mayor frecuencia que las bacterias planctónicas, de vida libre (Donlan & Costerton, 2002). A fin de prevenir el gran número de infecciones nosocomiales asociadas a material sanitario contaminado, es necesario investigar los mecanismos implicados en la formación de biopelículas, con el objetivo de identificar dianas terapéuticas e impedir su formación.

Actualmente se considera que las biopelículas son una causa frecuente de contaminación asociada a los dispositivos médicos, como los catéteres y prótesis (Soll, 2008). Los catéteres son dispositivos médicos muy favorables para la formación de biopelículas debido a que, tras su inserción, los componentes de la sangre como la fibrina, fibrinógeno, fibronectina y laminina, entre otros, favorecen la adhesión de diferentes microorganismos. Una vez adheridos, el hospedador proporciona los nutrientes necesarios para que los microorganismos puedan multiplicarse y proliferar, y, por tanto, formar biopelículas maduras (Aguinaga & Del Pozo, 2011).

1.4. Microorganismos formadores de biopelículas en dispositivos médicos

Se estima que más de un 80% de las infecciones producidas por bacterias en humanos están asociadas a las biopelículas, por lo que uno de los principales objetivos de la microbiología clínica es impedir su formación. Entre los microorganismos más comunes, causantes de estas infecciones, se encuentran *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y Enterobacterias como *Escherichia coli* (Römling & Balsalobre, 2012). Recordemos que el humano es portador de estas bacterias en su piel y mucosas, constituyendo un reservorio y factor de riesgo añadido importante (Ibáñez Franco et al., 2022).

Según Oliveira et al., 2018, el porcentaje de dispositivos implantados que se ven colonizados por *S. aureus* o *S. epidermidis* oscila entre el 10 y el 20%, dependiendo del tipo de dispositivo y el sitio de infección. De ese porcentaje, entorno al 25% de los pacientes mueren a causa de una bacteriemia causada por *S. aureus*. El número de pacientes que fallecen es ligeramente menor en el caso de *S. epidermidis*, pero sigue siendo significativo (van Hal et al., 2012). Estos números pueden ser incluso peores en



individuos con condiciones patológicas previas como enfermedad renal crónica en tratamiento de hemodiálisis, presencia de diabetes mellitus, hipertensión arterial, hipoalbuminemia o inmunodeprimidos. La elevada mortalidad asociada a infecciones producidas por estas especies se debe principalmente a su capacidad para formar biopelículas, ya que estas dificultan su erradicación y potencian su patogenicidad. De hecho, las biopelículas son el motivo por el que la mitad de los catéteres se retiran durante el primer año tras su inserción (Soi et al., 2016). Con todo lo expuesto, investigar los mecanismos de formación de biopelículas es de especial importancia para diseñar dianas terapéuticas y prevenir sus consecuencias. En este estudio nos centramos en *S. epidermidis*, ya que en la actualidad es el principal responsable de sepsis nosocomiales (Nguyen et al., 2017).

1.5. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis es un coco Gram positivo que se encuentra en la piel y las mucosas de los seres humanos. Es una de las especies más comunes del género *Staphylococcus* junto con *S. aureus*, diferenciándose de este último por ser coagulasa negativa. *S. epidermidis* es una bacteria comensal, sin embargo, puede comportarse como patógena oportunista, capaz de causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos y se considera una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Vuong & Otto, 2002). Los mecanismos de patogenicidad de *S. epidermidis* se basan en la evasión del sistema inmune del hospedador y, a diferencia de otras especies de estafilococos, no produce toxinas. Sin embargo, la infección sinérgica de *S. aureus*, productor de toxinas, y *S. epidermidis*, como reservorio de genes de resistencia, incrementa su patogenicidad y resistencia antibiótica (Otto, 2009).

Gracias a diferentes sustancias de agregación como la PIA, *S. epidermidis* forma fácilmente biopelículas, las cuales muestran elevada resistencia a los antibióticos, dificultando su erradicación. La única solución, una vez el dispositivo médico ha sido colonizado, es retirarlo y volver a colocar uno nuevo. Debido a las complicaciones clínicas derivadas de esta patología, la tasa de mortalidad es superior al 30%, entre la población de pacientes inmunocomprometidos (Pavlovsky et al., 2013). Por tanto, parece lógico pensar que prevenir la formación de las biopelículas sobre los dispositivos



médicos disminuirá las complicaciones médicas de los pacientes, incrementando su supervivencia.

2. OBJETIVOS

La contaminación, por *S. epidermidis*, del material médico es una de las principales causas de las infecciones nosocomiales. Entre sus factores de virulencia destacan la capacidad de formar biopelículas y la resistencia, de estas estructuras, a los antibióticos. La PIA es uno de los factores determinantes para la adhesión de la bacteria y la progresión de la biopelícula, siendo por tanto una diana terapéutica de prevención. En este trabajo investigamos la dependencia de la PIA, de dos cepas clínicas de *S. epidermidis*, para adherirse y formar biopelículas. Para ello planteamos los siguientes objetivos:

- Determinar si las cepas clínicas de *S. epidermidis*, aisladas de pacientes, son capaces de formar biopelículas dependientes de glucosa, sugiriendo la síntesis de la PIA.
- Determinar si las cepas de *S. epidermidis* son capaces de adherirse a superficies plásticas dependiente de glucosa, sugiriendo la síntesis de la PIA.
- Determinar si las cepas de *S. epidermidis* producen la PIA.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivo

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Caldo nutritivo (8 g/l, Millipore), utilizado como medio base. Para preparar el correspondiente medio sólido (agar nutritivo), se añadió agar (13 g/l, PanReac) como agente solidificante.
- Caldo nutritivo suplementado con diferentes componentes:
 - Caldo nutritivo + glucosa (2,5 g/l, Sigma), la misma concentración de glucosa que contiene el medio triptona y soja.
 - Caldo nutritivo + etanol (4%, Acofar) (Knobloch et al., 2001).



- Caldo nutritivo + NaCl (4%, Honeywell) + glucosa (0,5%, Sigma) (Knobloch et al., 2001)
- Caldo de triptona y soja (30 g/l, Millipore), utilizado como control positivo en la inducción de formación de biopelículas en la interfase líquido-aire (Benthien et al., 2022).

Los medios de cultivos reconstituidos se autoclavaron (autoclave vertical, Raypa) a 121°C, 20 min. En los medios que contenían etanol, este se añadió después del autoclavado. Los medios se conservaron en nevera a 4°C hasta su uso posterior.

3.2. Cepas bacterianas

Las especies utilizadas en este estudio fueron *S. aureus*, como cepa de referencia (colección española de cultivos tipo, CECT) y dos cepas de *S. epidermidis* (cepas 2037-25 y 6924-20) aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales (Hospital de la Candelaria), estas últimas cedidas por el Dr. Eduardo Pérez Roth (Área de Microbiología de la ULL). La cepa *S. epidermidis* 6924-20 fue obtenida a partir de un hemocultivo, el 17 de junio del 2008, por parte del Servicio de Cirugía Digestiva. Tras el análisis correspondiente, se determinó que esta cepa presentaba resistencia a la penicilina y a la mupirocina. Por su parte, *S. epidermidis* 2037-25 fue aislada a partir de un catéter, el 25 de julio de 2008, por la Unidad de Medicina Intensiva. Esta cepa presentó resistencia a múltiples medicamentos antimicrobianos (ácido fusídico, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, fosfomicina, gentamicina, mupirocina, penicilina, tetraciclinas, tobramicina y trimetoprima sulfametoxazol). Todas las cepas utilizadas fueron conservadas a -80°C en tubos para conservación de muestras microbiológicas (Cryoinstant) hasta su uso.

3.3. Mantenimiento de las cepas.

Durante el desarrollo de este trabajo las cepas se cultivaron (37°C) y conservaron (4°C) en agar nutritivo. Para ello, los microorganismos se sembraron por agotamiento a fin de obtener colonias aisladas que se emplearon para inocular los distintos experimentos.



3.4. Formación de biopelículas dependientes de glucosa en la interfase líquido-aire.

La capacidad para formar biopelículas depende, al menos parcialmente, de la producción de la PIA. La síntesis de estos polisacáridos se ve estimulada por la presencia de glucosa, por lo que se considera que es un inductor de la formación de las biopelículas. A fin de demostrar la formación de biopelículas dependientes de la PIA, inducido por glucosa, las bacterias se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 ml), conteniendo 20 ml de diferentes medios de cultivo: caldo nutritivo (CN), caldo nutritivo suplementado con glucosa (CN+G) y, como control positivo, caldo de triptona y soja (TSB) (Benthien et al., 2022). El experimento se realizó por duplicado, inoculando cada uno de los matraces con una colonia aislada en medio agar nutritivo. Una vez inoculados, se incubaron a 37°C, con agitación orbital (170 rpm) durante 4 días. Cada 24h se tomaron imágenes de la interfase líquido-aire para valorar la formación de biopelículas.

3.5. Capacidad de adhesión sobre plástico de PET, dependiente de glucosa.

Debido a que gran parte del material sanitario está constituido por plástico, se evaluó la capacidad de las cepas para adherirse a este material. Como modelo se utilizó el polietileno tereftalato (PET), un plástico de uso común en muchos dispositivos médicos, debido a sus propiedades: aislante térmico, alto punto de fusión, transparencia, posibilidad de reciclaje, etc. (Botero Jaramillo et al., 2014; Camacho Ramírez et al., 2013).

La capacidad de adhesión al PET de las bacterias se ensayó cultivándolas en caldo nutritivo y en caldo nutritivo suplementado con glucosa (30 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad). Después de 24 horas de incubación, se tomaron alícuotas de 3 ml de cada matraz que fueron diluidos en el mismo medio de cultivo (estéril) hasta obtener una densidad óptica de 0,5 de absorbancia a 600nm (Espectrofotómetro Beckman DU-800). Seguidamente, por cada matraz, se colocaron 2 gotas de 100 μ l (réplicas técnicas) sobre una lámina de PET de 2x4cm², separadas entre sí unos 2 cm. Las láminas se dejaron 2h a 37°C para permitir la adhesión de las bacterias.



A continuación, se lavaron intensamente con agua, se tiñeron con cristal violeta (2 min), se lavaron con agua nuevamente y se procedió a su observación al microscopio.

Cada uno de los plásticos fue fotografiado con el objetivo 100X (1000 aumentos, Olympus BX50) usando una cámara (Canon, EOS 550D) adaptada con un soporte para microscopio. Las fotos fueron transferidas al programa ImageJ (software de análisis de imagen, versión 1.54d) donde se calculó el porcentaje de área teñida, equivalente a las células adheridas. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el software GraphPad Prism (Versión 8.0.2 (263)). El análisis rutinario incluye la identificación de outliers (Q=10%), prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y el test estadístico correspondiente a la normalidad (ANOVA para los paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos).

3.6. Capacidad de adhesión sobre plástico de poliestireno, dependiente de glucosa.

El poliestireno tratado para cultivo celular genera superficies hidrófilas que facilitan la adhesión. En estos ensayos, las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo y en caldo nutritivo con glucosa (30 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml durante 24 h a 37°C y en agitación, 140 rpm). Transcurrido el periodo de incubación, las células contenidas en 2 ml de medio se recuperaron por centrifugación (4000 rpm, 3 min) y se resuspendieron en medio de cultivo fresco hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 de absorbancia a 600 nm. Las células recuperadas de caldo nutritivo se resuspendieron en caldo nutritivo (CN > CN) y en caldo nutritivo con glucosa (CN > CNG). De la misma forma, las células recuperadas de caldo nutritivo con glucosa se resuspendieron en caldo nutritivo (CNG > CN) y en caldo nutritivo con glucosa (CNG > CNG). A continuación, se rellenó cada pocillo, de una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Nunclon™ Delta Surface), con 200 µL de cada una de las suspensiones bacterianas y un blanco con solo medio. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas. De cada condición experimental se hicieron 6 réplicas (n=6), repitiendo el experimento por triplicado (N=3). Tras el periodo de incubación, se desechó el medio y los pocillos se lavaron 2 veces con 200 µL de solución salina (1% NaCl, Honeywell) para eliminar los restos de medio de cultivo y las bacterias en suspensión. Posteriormente, las bacterias adheridas se tiñeron

con 200 μ L de safranina (Sigma-Aldrich) durante 15min. Después de la tinción, se desechó el colorante y los pocillos se lavaron 2 veces con 200 μ L de solución salina. Finalmente, las bacterias se decoloraron con 200 μ L de etanol 95% durante 15min a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica de los pocillos en un lector ELISA (Tecan Infinite M200) a 540nm. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software GraphPad Prism.

3.7. Determinación de la producción de la PIA por microscopía.

La producción de la PIA se determinó incubando las bacterias en 10 ml de caldo nutritivo suplementado con glucosa en matraces Erlenmeyer de 100 ml e incubados a 37°C, 140 rpm, durante 72 h (Bottagisio et al., 2019). Además de las condiciones básicas de inducción de la síntesis de la PIA, se emplearon otros dos estímulos: el primero añadiendo un 4% de etanol y el segundo un 4% de NaCl y 0.5% de glucosa al medio básico descrito anteriormente (Agarwal & Jain, 2013; Conlon et al., 2002; Lerch et al., 2019). Estos cultivos fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de bacterias (incubada a 37°C, 140 rpm, 24 h) con una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala MacFarland. Como control negativo se utilizaron los medios de cultivo sin inocular. A la finalización de la incubación, 30 μ L de suspensión bacteriana se depositaron en un portaobjetos, se extendió sobre la superficie y se dejó secar al aire. Los polisacáridos extracelulares, como la PIA se tiñeron con azul alcian (5 min, Bottagisio et al., 2019) y las células con safranina (2 min). Como se ha descrito anteriormente se adquirieron múltiples campos ópticos al microscopio (aumentos x1000) para su posterior análisis. La presencia de coloración por tinción con azul alcian, como presencia de la PIA, se cuantificó mediante el método de graduación. Empleando imágenes representativas se estableció una escala de tinción con valores comprendidos entre 1 y 5 (Figura 2). Los

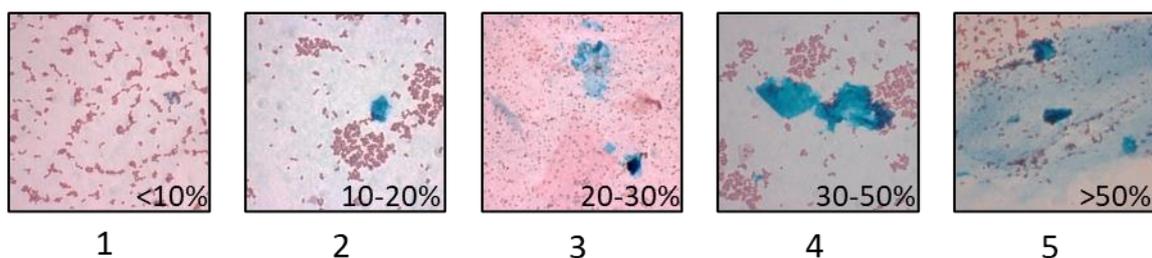


Figura 2. Escala de referencia para la valoración visual de la cantidad de la PIA producida.

valores así obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el software GraphPad Prism como se ha descrito anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Capacidad de *S. epidermidis* de formar biopelículas dependientes de glucosa.

La formación de biopelículas por las cepas de *S. epidermidis* se evaluó por la formación de un anillo de biomasa en la interfase líquido-aire según describe Benthien et al., 2022. A las 24 h de incubación en el medio TSB control podemos observar la formación de una pequeña biopelícula en ambas cepas de *S. epidermidis*, un poco más perceptible en la cepa 2037-25 (Figura 3, flecha roja). Por otra parte, *S. aureus* mostró una acumulación comparable de biomasa en la interfase bajo las mismas condiciones. En contraste, encontramos en los cultivos de caldo nutritivo suplementados con glucosa que las cepas de *S. epidermidis* produjeron una cantidad mayor de biomasa en la interfase, destacando la cepa 2037-25, comparado con el medio control sin glucosa o incluso el TSB. Bajo estas mismas condiciones, *S. aureus* formó una ligera biopelícula, comparable a la del medio TSB. Ninguna de las cepas ensayadas produjo biopelícula en la interfase del caldo nutritivo no suplementado. Es de notar, que *S. aureus* es capaz de crecer en agar nutritivo, sin embargo, observamos un crecimiento mucho más lento en el caldo nutritivo comparado con el resto de las condiciones, acorde a la turbidez del medio.

Trascurridas 48 h la cantidad de biopelícula en medio control TSB no varió de manera considerable con respecto al día anterior. Sin embargo, en caldo nutritivo suplementado con glucosa, la cepa 2037-25 vio disminuida su biomasa (posiblemente debido a un sobrecrecimiento, la biomasa se desprendió), mientras que la cepa 6924-20 y *S. aureus* experimentaron un ligero aumento en el anillo de células. En las condiciones control sin glucosa no se apreció formación de la biopelícula. A las 96 h, no observamos grandes diferencias respecto a las 48 h, aparte de la pérdida de biomasa en algunas condiciones que parecen haber llegado a saturación.



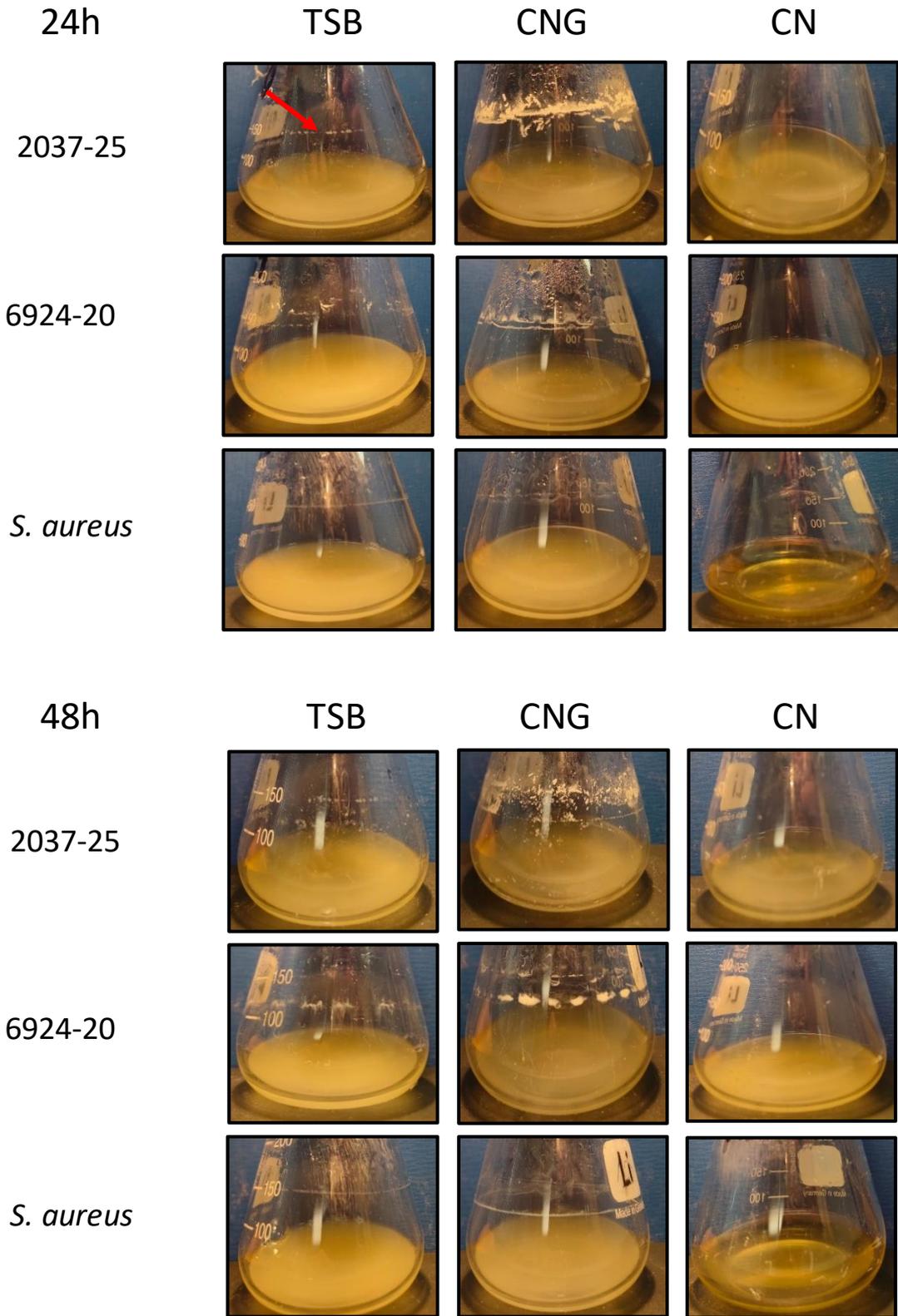
4.2. Capacidad de adhesión de *S. epidermidis* sobre superficies plásticas.

4.2.1. Adhesión sobre material plástico de PET.

El porcentaje de área cubierta por las bacterias adheridas al material plástico PET no presenta diferencias significativas, respecto a sus controles. Sin embargo, se observa una tendencia a la adhesión en presencia de glucosa para la cepa 2037-25 y *S. aureus* (Figura 4). En contraste, la cepa 6924-20 parece comportarse a la inversa, tiende a adherirse más en la condición control sin glucosa.

4.2.2. Adhesión a material plástico de poliestireno.

Para determinar la capacidad de adhesión de las bacterias, sobre una superficie pretratada que la favorece, se realizaron ensayos similares a los anteriores en formato de placas de 96 pocillos, compuestas de poliestireno. A las 24 h de cultivo observamos que tanto la cepa 2037-25 como *S. aureus* no muestran diferencias de adhesión significativas entre la condición control y suplementada con glucosa. Por su parte, la cepa 6924-20 presenta un grado de adhesión significativamente mayor ($p < 0,001$) en presencia de glucosa (CN > CN comparado con CNG > CNG). Siendo la adhesión mayor cuanto mayor es el tiempo de exposición a la glucosa (CN > CNG comparado con CNG > CNG). El comportamiento de incremento de adhesión fue similar cuando la cepa fue expuesta a glucosa en el primer cultivo y luego eliminada (CNG > CN comparado con CNG > CNG), conservando el fenotipo ($p < 0,001$). Trascorridas 48 h de incubación no se apreciaron grandes diferencias con respecto a las 24 h.



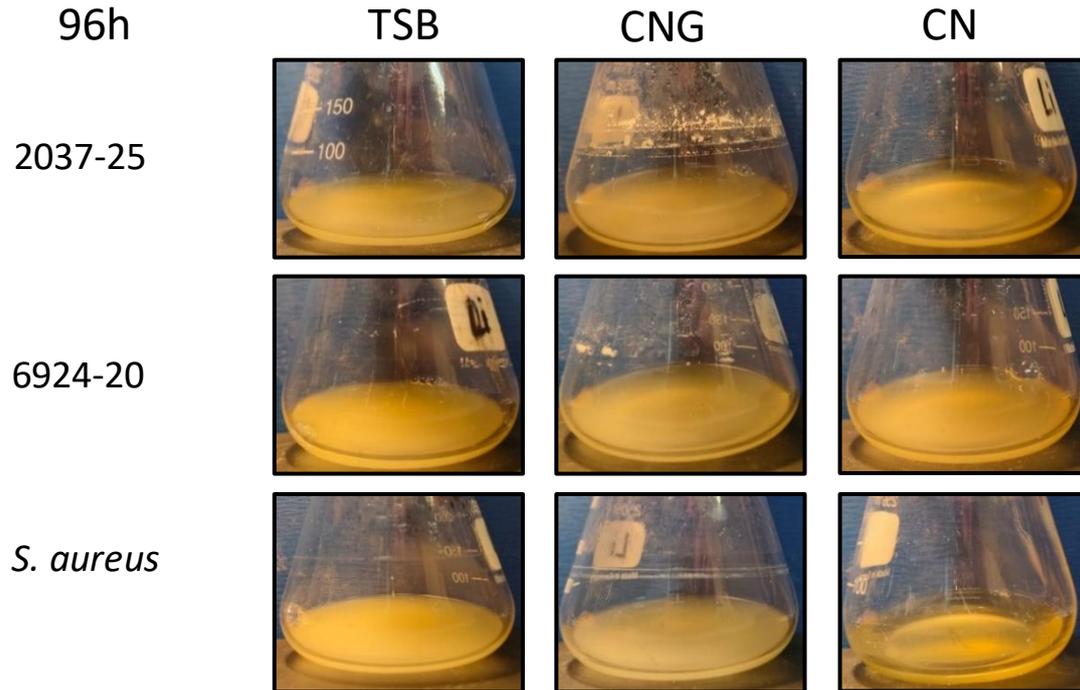


Figura 3. Formación de biopelículas dependientes de glucosa. Imágenes de los cultivos de *Staphylococcus aureus* y las cepas de *Staphylococcus epidermidis* 2037-25 y 6924-20 en caldo de triptona y soja (TSB), caldo nutritivo con glucosa (CNG) y caldo nutritivo (CN) a diferentes tiempos (24, 48 y 96h; N=2). La flecha indica la zona de formación de la biopelícula en la interfase líquido-aire.

4.3. Producción de la PIA dependiente de glucosa.

La adhesión de *S. epidermidis* puede ser debida a múltiples factores, incluida la síntesis de la PIA. A fin de demostrar el incremento de la PIA, en las bacterias estimuladas con glucosa, cuantificamos por microscopía su producción (Figura 6). Las cepas de *S. epidermidis* incubadas en presencia de glucosa no mostraron incremento en la producción de la PIA. En todo caso, la producción de la PIA parece ser mayor en la condición control, no suplementada, en la cepa 2037-25 ($p=0,0233$). Por su parte, *S. aureus* a pesar de no presentar una diferencia significativa, sí que parece tener una tendencia a incrementar la síntesis de la PIA en la condición glucosada. Los otros estímulos (etanol y NaCl con glucosa) conocidos por estimular la síntesis de la PIA mostraron resultados similares a los descritos anteriormente. Los estímulos disminuyen la presencia de la PIA, excepto en *S. aureus* que responde a la condición salina glucosada.

Cabe decir que todas las bacterias vieron afectado su crecimiento en la presencia de etanol, lo que podría explicar al menos en esta condición, los resultados obtenidos.

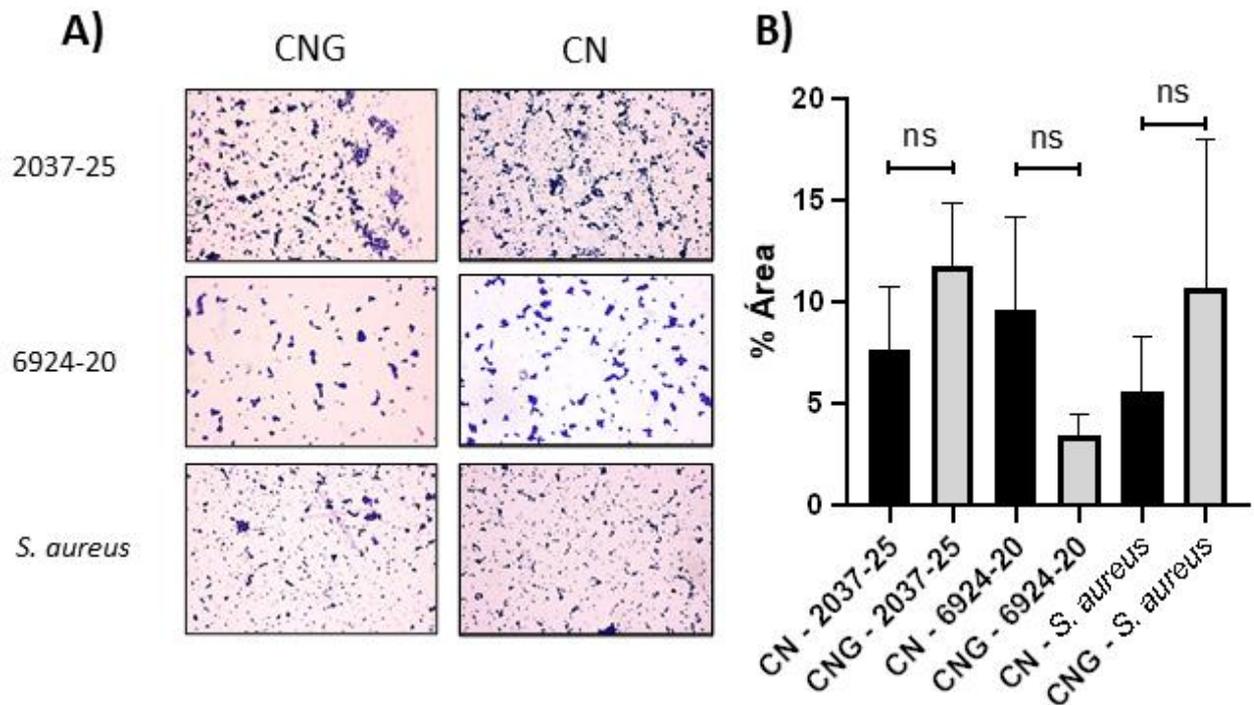


Figura 4. Adhesión bacteriana sobre la superficie plástica de PET. A) Imágenes representativas de las bacterias adheridas al plástico PET teñidas con cristal violeta. Las bacterias ensayadas son las cepas indicadas de *Staphylococcus epidermidis* (*S. ep.*) y *S. aureus* (n=2). Imágenes tomadas con x1000 aumentos. Las bacterias se incubaron en caldo nutritivo (CN) o suplementado con glucosa (CN+G). B) Cuantificación del porcentaje del área total ocupada por las bacterias. Las barras de error representan la desviación estandar y ns= no significativo.

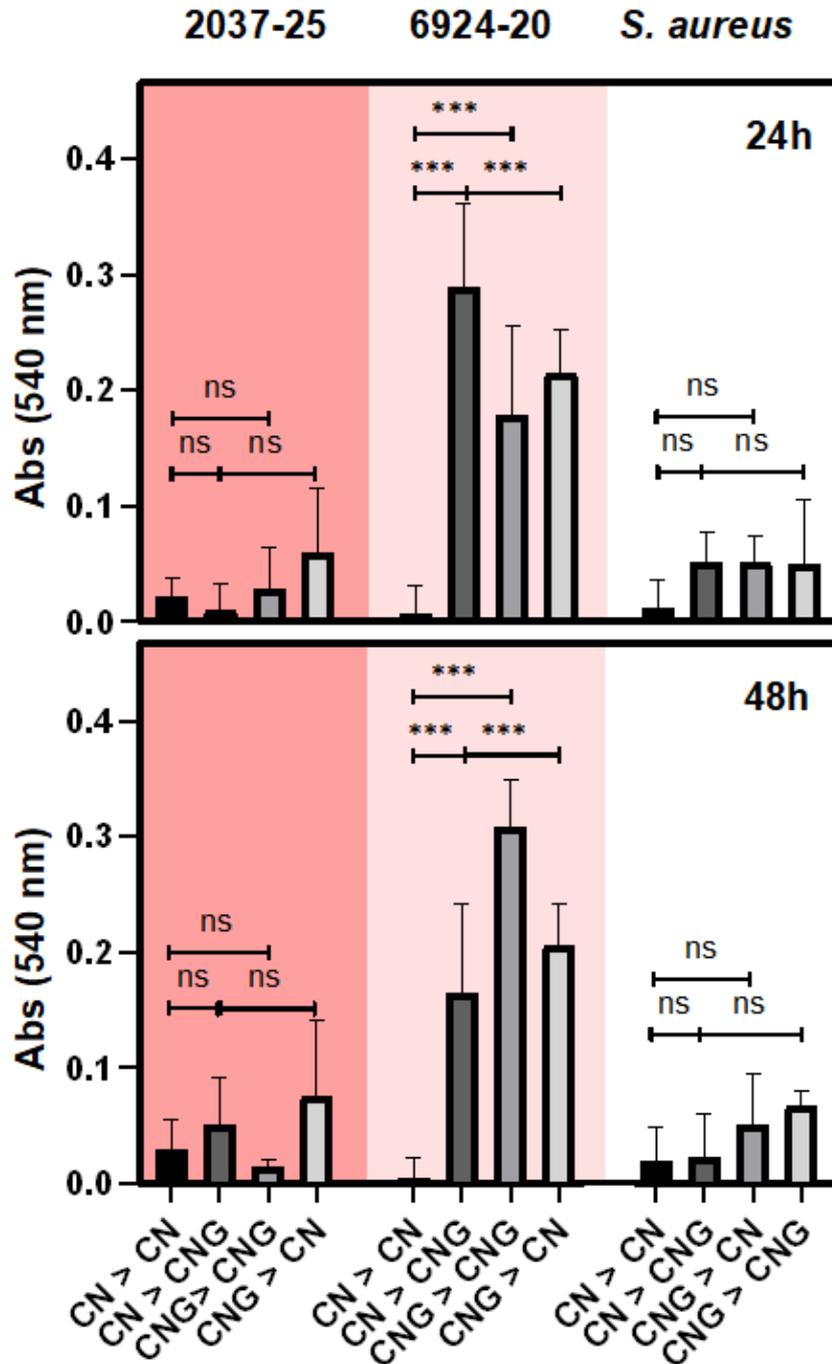


Figura 5. Adhesión bacteriana sobre superficie plástica de poliestireno tratado. Los histogramas representan la absorbancia a 540nm de la safranina liberada de las bacterias adheridas a los pocillos. Se ensayaron las cepas de *S. epidermidis* 2037-25, 6924-20 y *S. aureus* en diferentes combinaciones de caldo nutritivo (CN) y suplementado con glucosa (CNG). Siempre caldo nutritivo (CN>CN), siempre suplementado con glucosa (CNG>CNG), suplementando en la segunda incubación (CN>CNG) o retirando la suplementación en la segunda incubación (CNG>CN). Las barras horizontales indican las condiciones experimentales comparadas y su significancia: ns= no significativo; *** $p \leq 0.001$.

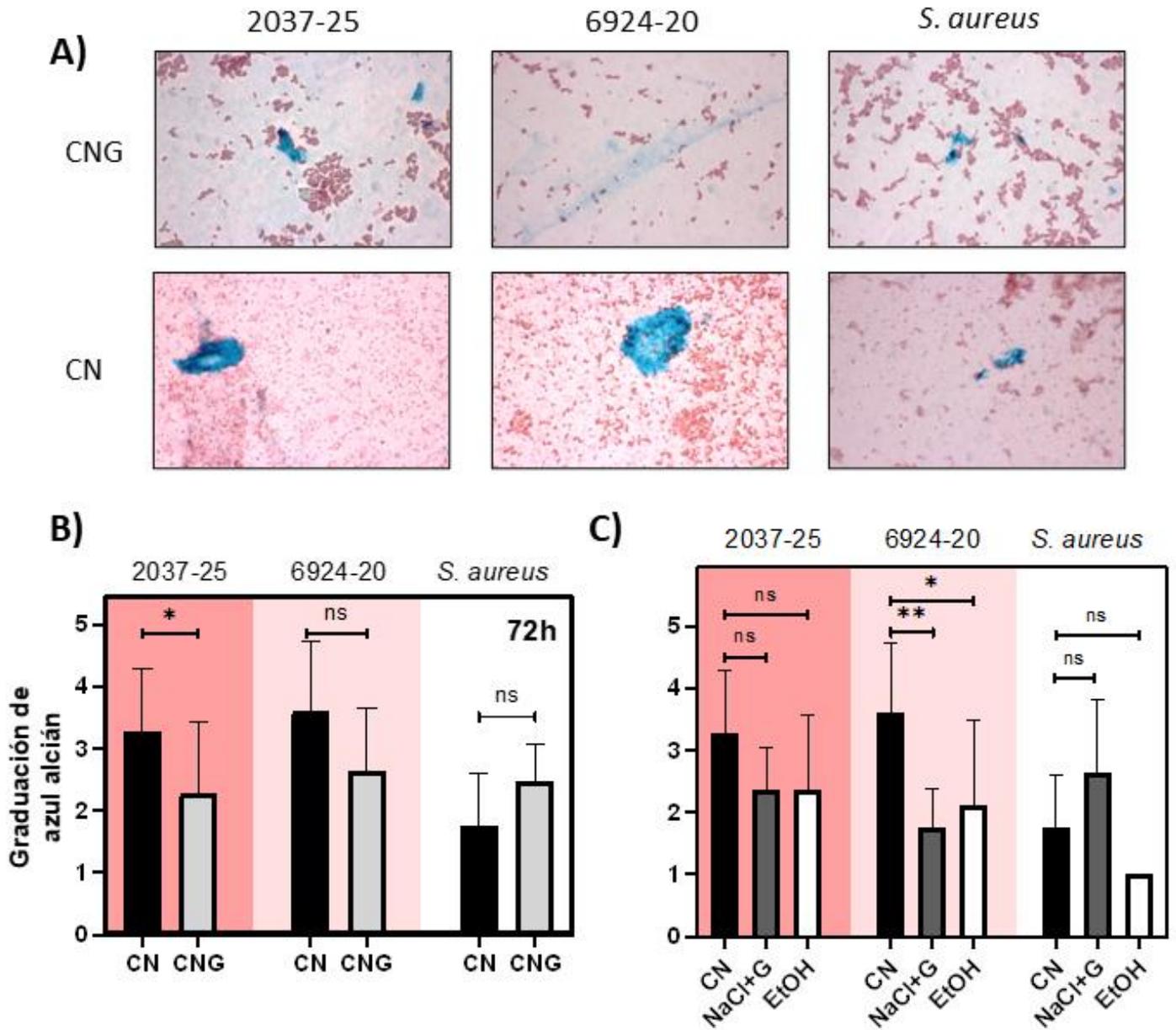


Figura 6. Cuantificación de la producción de la PIA bajo diferentes estímulos. A) Imágenes representativas de la tinción de los polisacáridos extracelulares con azul alcian (color azul) y las bacterias con safranina (rosa). Se ensayaron las cepas de *S. epidermidis* 2037-25, 6924-24 y *S. aureus* incubadas en caldo nutritivo (CN) o suplementado con glucosa (CNG) tras 72h. B) Histograma representando la cuantificación del área teñida de azul, acorde a la escala visual (1-5). C) Histograma de cuantificación del área teñida de azul, de las mismas cepas incubadas en caldo nutritivo durante 72h y suplementadas con NaCl y glucosa o etanol (EtOH), durante 96 h. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras horizontales indican las condiciones experimentales comparadas y su significancia: ns= no significativo; * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$.



5. DISCUSIÓN

La capacidad para formar biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* les permite contaminar instrumentos médicos como los catéteres o las prótesis, provocando importantes problemas sanitarios. Estas bacterias, normalmente comensales, pueden causar estados patológicos graves si se liberan, desde las biopelículas, dentro del cuerpo del paciente (Wang et al., 2011). La principal medida para evitar la contaminación, es la correcta manipulación del instrumental, que pasa por la formación del personal sanitario (Hischebeth et al., 2019; O'Grady et al., 2011). Sin embargo, en Servicios como los de Urgencias con frecuencia los protocolos pierden prioridad frente a la vida del paciente, lo que incrementa la probabilidad de contaminación por biopelículas (Corrêa Carvalho et al., 2022). Una vez estas se han formado, eliminarlas es extremadamente difícil, debido a la matriz extracelular que crea un ambiente favorable para los microorganismos y los protege (Dos Santos et al., 2018). Por tanto, evitar la adhesión de las bacterias a las superficies, mucho antes de que maduren en forma de biopelículas, es una diana terapéutica lógica. Nuestros resultados muestran que los mecanismos de adhesión de dos cepas clínicas de *S. epidermidis* son similares en algunos aspectos y sustancialmente diferentes en otros. Lo que sugiere que las futuras terapias dirigidas a la adhesión requieren un conocimiento personalizado de los mecanismos moleculares.

Entre los factores de adhesión de *S. epidermidis*, la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA), codificado por el locus *ica*, contribuye significativamente a la adhesión, formación de biopelículas estafilocócicas y evasión del sistema inmunológico (Calà et al., 2015; Dobinsky et al., 2003). Su producción está influenciada por múltiples condiciones ambientales como es la disponibilidad de glucosa y condiciones de estrés salino (Agarwal & Jain, 2013). En nuestros experimentos, empleamos glucosa como agente inductor de la producción de la PIA y evaluamos la capacidad de adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis*. Observamos que la presencia de glucosa indujo la formación de biopelícula en la interfase líquido-aire, sugiriendo la síntesis de la PIA (Benthien et al., 2022). La reducción de la biomasa observada a partir de las 48 h de incubación, en la cepa 2037-25, sugiere que la biopelícula madura entró en fase de dispersión (Holá et al., 2006), evidenciando diferencias en la velocidad de la formación



de las biopelículas entre las cepas de *S. epidermidis* y con *S. aureus*. Los siguientes experimentos, empleando técnicas y superficies diferentes (plásticos PET y poliestireno), mostraron diversidad de comportamientos en la formación de biopelículas dependiente de glucosa. Estas diferencias pueden ser reflejo de la complejidad y diferencias de composición molecular que las diferentes bacterias poseen en su superficie y que afectan a la adhesión. Además de la PIA, *S. epidermidis* posee otras adhesinas como AtlE, ácido teicoico, MSCRAMM, Fbe (SdrG), Embp, SSP-1 y SSP-2, entre otras. La combinación de las adhesinas hace que la adhesión de las bacterias responda a características diferentes de las superficies como son la carga, hidrofobicidad o composición favoreciendo o inhibiéndola (Vila et al., 2008). Nuestros resultados sugieren que las cepas de *S. epidermidis* sintetizan una combinación de adhesinas específica, dependiente de glucosa, que les permite adherirse ávidamente a unos sustratos, pero se los impide en otros. Múltiples investigaciones han demostrado que las bacterias poseen diferentes tasas de adhesión dependiendo de la rugosidad de los materiales (Cao et al., 2018; Yoda et al., 2014), la hidrofobicidad (Xu & Siedlecki, 2014), los recubrimientos de flúor (Pérez-Jorge et al., 2012), o incluso los recubrimientos constituidos por las propias proteínas del huésped (Dos Santos et al., 2018).

Otra explicación posible a las diferencias de adhesión observadas entre los diferentes experimentos puede ser la presencia diferencial de estrés. Existen evidencias que demuestran el incremento de adhesión de *S. epidermidis* bajo condiciones de estrés químico (por ejemplo, presencia de etanol o concentraciones elevadas de NaCl, Agarwal & Jain, 2013), donde además se estimula la síntesis de la PIA, y físico (por ejemplo, superficies con alto grado de cizallamiento, Donlan & Costerton, 2002). En nuestros experimentos, al menos podemos identificar un estrés físico en la interfase líquido-aire, que explicaría porqué todas las bacterias formaron las biopelículas estimuladas por la glucosa, independientemente de la superficie. Aunque no podemos determinar si es dependiente de la PIA (Benthien et al., 2022).

No pasa desapercibido que la glucosa está relacionada con la formación de las biopelículas en nuestros experimentos y que la síntesis de la PIA, compuesta principalmente por (glico)proteínas, (gluco)lípidos, (mono)/(poli)sacáridos, entre otras moléculas, es estimulada por el glúcido (Bottagisio et al., 2019; Dos Santos et al., 2018).



Apoyando estas observaciones, la regulación negativa del locus *ica* por la actinomicina D, derivada de *Streptomyces*, es capaz de inhibir la formación de biopelículas de *S. epidermidis*, al alterar la composición de la PIA (Mu et al., 2020). Sin embargo, nosotros no logramos detectar diferencias en la síntesis de la PIA, mediante tinción inespecífica con azul alcian, de las bacterias estimuladas con glucosa o incluso bajo condiciones de estrés con etanol o NaCl con glucosa, a pesar del incremento de adhesión registrado (Agarwal & Jain, 2013; Conlon et al., 2002; Lerch et al., 2019). Es posible que el operón *icaADBC* no se active por ninguno de los estímulos empleados en las cepas ensayadas y el incremento de adhesión dependa de otras adhesinas glucosa dependientes. En conclusión, es necesario confirmar nuestras observaciones empleando otras técnicas complementarias como: cuantificar los niveles de expresión génica del operón *icaADBC*, niveles de proteína relacionadas con la síntesis y transporte de la PIA o tinción específica de la PIA (Bottagisio et al., 2019; Foka et al., 2012; Swolana et al., 2022).

La variabilidad de respuestas, observadas en el presente trabajo, en la respuesta de adhesión estimulada por glucosa y sobre diferentes superficies y condiciones experimentales de dos cepas de *S. epidermidis* aisladas de pacientes sugiere que poseen mecanismos de adhesión específicos, lo que dificulta encontrar dianas terapéuticas comunes de uso universal. Es posible que dianas centradas en bloquear la PIA no sean eficaces para evitar la adhesión de las cepas clínicas de *S. epidermidis*. Sin embargo, sí podrían reducir significativamente los eventos de contaminación por biopelículas, sobre el instrumental médico, si se evitaran las condiciones fisicoquímicas que inducen su síntesis y promueven la adhesión. Finalmente, cabe considerar que otro punto de vista recientemente defendido, consiste en evitar el riesgo, como por ejemplo evitando la inserción de los catéteres, debido a todas las complicaciones que puede tener la infección de este, sumados a que el tratamiento y la calidad de vida del paciente se pueden ver afectados (Ronin et al., 2022).

6. Conclusiones

1. Las cepas clínicas de *S. epidermidis* y *S. aureus* forman biopelículas dependientes de glucosa en la interfase líquido-aire.



2. Ninguna de las bacterias ensayadas se adhiere al plástico PET, estimuladas por glucosa.
3. Únicamente la cepa 6924-20 de *S. epidermidis* se adhiere al plástico poliestireno tratado en presencia de glucosa. Ni la cepa 2037-25 de *S. epidermidis* ni *S. aureus* lo hicieron.
4. La cepa 6924-20 de *S. epidermidis* mantiene la capacidad de adhesión, a la superficie tratada de poliestireno, incluso después de eliminar el estímulo de glucosa.
5. Las cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* estimuladas con glucosa, no incrementaron la síntesis de polisacáridos extracelular, cuantificado mediante tinción inespecífica con azul alcian.

Conclusions

1. Clinical strains of *S. epidermidis* and *S. aureus* form glucose-dependent biofilms at the fluid-air interface.
2. None of the bacteria tested adhere to PET plastic, stimulated by glucose.
3. Only *S. epidermidis* strain 6924-20 adheres to the treated polystyrene plastic in the presence of glucose. Strains 2037-25 of *S. epidermidis* and *S. aureus* did not.
4. *S. epidermidis* strain 6924-20 retains the ability to adhere to the polystyrene treated surface even after removal of the glucose stimulus.
5. Strains of *S. epidermidis* and *S. aureus* stimulated with glucose did not increase the synthesis of extracellular polysaccharides, quantified by nonspecific staining with alcian blue.

7. Limitaciones

Las limitaciones de este estudio científico radican en la falta de información sobre las dos cepas clínicas desconocidas de *Staphylococcus epidermidis*. Esta carencia impide prever su comportamiento esperado, lo que constituye una limitación significativa. Para superarlo y realizar comparaciones, se podrían llevar a cabo experimentos utilizando cepas de referencia conocidas. Por ejemplo, se podría utilizar la cepa ATCC35984 (RP62A), que es capaz de adherirse para formar biopelículas, y la cepa ATCC12228, que

carece de capacidad de adhesión a las superficies. De esta manera, se establecería una base de referencia para contrastar los resultados obtenidos con las cepas desconocidas.

Además, se debería incluir un mayor número de cepas clínicas de *S. epidermidis* para obtener una perspectiva más amplia de las características de adhesión y producción de PIA en entornos clínicos. Esto ayudaría a mejorar la generalización de los resultados y proporcionaría una base más sólida para la toma de decisiones clínicas relacionadas con la formación de biopelículas y la producción de PIA en esta especie bacteriana.

Los experimentos realizados con cepas bacterianas desconocidas requieren de una mayor cantidad de réplicas biológicas para aumentar la significancia estadística de los ensayos.

8. Bibliografía

Agarwal, A., & Jain, A. (2013). Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian Journal of Medical Research*, 138(2), 262-266.

Aguinaga, A., & Del Pozo, J. L. (2011). Infección asociada a catéter en hemodiálisis: Diagnóstico, tratamiento y prevención. *Nefrología*, 4(2), 1-10. <https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2011.Jun.11016>

Benthien, H., Fresenborg, B., Pätzold, L., Elhawy, M. I., Huc-Brandt, S., Beisswenger, C., Krasteva-Christ, G., Becker, S. L., Molle, V., Knobloch, J. K., & Bischoff, M. (2022). The Transcription Factor SpoVG Is of Major Importance for Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis* under In Vitro Conditions, but Dispensable for In Vivo Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3255. <https://doi.org/10.3390/ijms23063255>

Botero Jaramillo, E., Muñoz, L., Ossa, A., & Romo, M. P. (2014). Comportamiento mecánico del Polietileno Tereftalato (PET) y sus aplicaciones geotécnicas. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 70, 201-219.

Bottagisio, M., Soggiu, A., Piras, C., Bidossi, A., Greco, V., Pieroni, L., Bonizzi, L., Roncada, P., & Lovati, A. B. (2019). Proteomic Analysis Reveals a Biofilm-Like Behavior of Planktonic Aggregates of *Staphylococcus epidermidis* Grown Under Environmental Pressure/Stress. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01909>

Calà, C., Amodio, E., Di Carlo, E., Virruso, R., Fasciana, T., & Giammanco, A. (2015). Biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from the skin of hospitalized patients: Genetic and phenotypic characteristics. *New Microbiologica*, 38(4), 521-529.

Camacho Ramírez, A., Díaz Godoy, A., Martínez Vieira, A., Calvo Durán, A., De la Vega Olías, C., Balbuena García, M., Nabjeb Alassad, A., & Vega Ruiz, V. (2013). Tipos de prótesis actuales. *Cirugía andaluza*, 24(3 y 4), 12-16.

Cao, Y., Su, B., Chinnaraj, S., Jana, S., Bowen, L., Charlton, S., Duan, P., Jakubovics, N. S., & Chen, J. (2018). Nanostructured titanium surfaces exhibit recalcitrance towards *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Scientific Reports*, 8(1), 1071. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19484-x>

Conlon, K. M., Humphreys, H., & O’Gara, J. P. (2002). IcaR Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of ica Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4400-4408. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4400-4408.2002>

Corrêa Carvalho, G., Miguel Sábio, R., Spósito, L., Andreoli Pinto, T. J., & Chorilli, M. (2022). An overview of the use of central venous catheters impregnated with drugs or with inorganic nanoparticles as a strategy in preventing infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 615, 121518. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121518>

Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J. K.-M., Horstkotte, M. A., & Mack, D. (2003). Glucose-Related Dissociation between icaADBC Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2879-2886. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2879-2886.2003>

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

Dos Santos, A. L. S., Galdino, A. C. M., Mello, T. P. de, Ramos, L. de S., Branquinha, M. H., Bolognese, A. M., Columbano Neto, J., & Roudbary, M. (2018). What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(9), e180-e212. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180212>

Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Foka, A., Katsikogianni, M. G., Anastassiou, E. D., Spiliopoulou, I., & Missirlis, Y. F. (2012). The combined effect of surface chemistry and flow conditions on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and ica operon expression. *European Cells and Materials*, 24, 386-402. <https://doi.org/10.22203/eCM.v024a28>

Hischebeth, G. T., Randau, T. M., Ploeger, M. M., Friedrich, M. J., Kaup, E., Jacobs, C., Molitor, E., Hoerauf, A., Gravius, S., & Wimmer, M. D. (2019). *Staphylococcus aureus* versus *Staphylococcus epidermidis* in periprosthetic joint infection—Outcome analysis of methicillin-resistant versus methicillin-susceptible strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(2), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.012>

- Holá, V., Ruzicka, F., & Votava, M. (2006). The dynamics of staphylococcus epidermidis biofilm formation in relation to nutrition, temperature, and time. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*, 79(3), 169-174.
- Ibáñez Franco, E. J., Fretes Ovelar, A. M. C., Duarte Arévalos, L. E., Giménez Vázquez, F. D. J., Olmedo Mercado, E. F., Figueredo Martínez, H. J., & Rondelli Martínez, L. F. (2022). Factores de riesgo asociados a infección de catéter de hemodiálisis en un centro de referencia. *Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, 9(1), 23-33. <https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2022.09.01.23>
- 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>
- Leuch, M. F., Schoenfelder, S. M. K., Marincola, G., Wencker, F. D. R., Eckart, M., Förstner, K. U., Sharma, C. M., Thormann, K. M., Kucklick, M., Engelmann, S., & Ziebuhr, W. (2019). A non-coding RNA from the intercellular adhesion (ica) locus of Staphylococcus epidermidis controls polysaccharide intercellular adhesion (PIA)-mediated biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 111(6), 1571-1591. <https://doi.org/10.1111/mmi.14238>
- Mu, Y. Q., Xie, T. T., Zeng, H., Chen, W., Wan, C. X., & Zhang, L. L. (2020). Streptomyces-derived actinomycin D inhibits biofilm formation via downregulating ica locus and decreasing production of PIA in Staphylococcus epidermidis. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1201-1207. <https://doi.org/10.1111/jam.14543>
- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3324-3334. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>
- Nguyen, T. H., Park, M. D., & Otto, M. (2017). Host Response to Staphylococcus epidermidis Colonization and Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00090>
- O'Grady, N. P., Alexander, M., Burns, L. A., Dellinger, E. P., Garland, J., Heard, S. O., Lipsett, P. A., Masur, H., Mermel, L. A., Pearson, M. L., Raad, I. I., Randolph, A. G., Rupp, M. E., & Saint, S. (2011). Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 52(9), e162-e193. <https://doi.org/10.1093/cid/cir257>
- Oliveira, W. F., Silva, P. M. S., Silva, R. C. S., Silva, G. M. M., Machado, G., Coelho, L. C. B. B., & Correia, M. T. S. (2018). Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, 98(2), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>
- Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis—The «accidental» pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>

Pavlovsky, L., G. Younger, J., & Solomon, M. J. (2013). In situ rheology of *Staphylococcus epidermidis* bacterial biofilms. *Soft Matter*, 9(1), 122-131. <https://doi.org/10.1039/C2SM27005F>

Pérez-Jorge, C., Conde, A., Arenas, M. A., Pérez-Tanoira, R., Matykina, E., de Damborenea, J. J., Gómez Barrera, E., & Esteban, J. (2012). In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(7), 1696-1705. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34118>

Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541-561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>

Ronin, D., Felix, R. B., Williams, C. M., Manuel, S. A., Goeres, D., Summers, J., LaFleur, J. E., & Kjellerup, B. V. (2022). Prevention of Biofilms in Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTIs): A Review. En K. Richter & K. N. Kragh (Eds.), *Antibiofilm Strategies: Current and Future Applications to Prevent, Control and Eradicate Biofilms* (Vol. 11, pp. 61-97). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-10992-8_4

Schaeffer, C. R., Hoang, T.-M. N., Sudbeck, C. M., Alawi, M., Tolo, I. E., Robinson, D. A., Horswill, A. R., Rohde, H., & Fey, P. D. (2016). Versatility of Biofilm Matrix Molecules in *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates and Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression during High Shear Stress. *mSphere*, 1(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00165-16>

Scheeren Brum, R., Apaza-Bedoya, K., Labes, L. G., Volpato, C. Â. M., Pimenta, A. L., & Benfatti, C. A. M. (2021). Early Biofilm Formation on Rough and Smooth Titanium Specimens: A Systematic Review of Clinical Studies. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 12(4), e1. <https://doi.org/10.5037/jomr.2021.12401>

Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies. *Microbial Cell*, 8(2), 28-56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>

Severn, M. M., & Horswill, A. R. (2023). *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 97-111. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00780-3>

Soi, V., Moore, C. L., Kumbar, L., & Yee, J. (2016). Prevention of catheter-related bloodstream infections in patients on hemodialysis: Challenges and management strategies. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 9, 95-103. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S76826>

Soll, D. R. (2008). *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? *Current Biology*, 18(16), 717-720. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.014>

Swolana, D., Kępa, M., Kruszniewska-Rajs, C., & Wojtyczka, R. D. (2022). Antibiofilm Effect of Silver Nanoparticles in Changing the Biofilm-Related Gene Expression of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9257. <https://doi.org/10.3390/ijms23169257>



- Tenorio, E., Saeki, T., Fujita, K., Kitakawa, M., Baba, T., Mori, H., & Isono, K. (2003). Systematic characterization of *Escherichia coli* genes/ORFs affecting biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1), 107-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00507-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00507-X)
- van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., & Gosbell, I. B. (2012). Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 362-386. <https://doi.org/10.1128/CMR.05022-11>
- Vila, J., Soriano, A., & Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(1), 48-55. <https://doi.org/10.1157/13114395>
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481-489. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01563-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01563-0)
- Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y. C., Bach, T.-H. L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S. Y., & Otto, M. (2011). *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 238-248. <https://doi.org/10.1172/JCI42520>
- Xu, L.-C., & Siedlecki, C. A. (2014). *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. *Biomedical Materials*, 9(3), 035003. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/3/035003>
- Yoda, I., Koseki, H., Tomita, M., Shida, T., Horiuchi, H., Sakoda, H., & Osaki, M. (2014). Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiology*, 14(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0234-2>