



Inhibición de adhesión bacteriana en catéteres vasculares por el péptido antimicrobiano AP7121

Inhibition of bacterial adherence to vascular catheters by the antimicrobial peptide AP7121

Sabina Lissarrague¹, Laureano Schofs², Mariana Bistoletti¹, Leonardo García Allende³, Andrea Lallée¹, Beatriz Baldaccini¹, Sergio Sánchez Bruni², Mónica Sparo*¹

¹ Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina;

² Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina- CIVETAN- CONICET;

³ Hospital Privado de Comunidad de Mar del Plata, Argentina.

RESUMEN

Las infecciones del torrente sanguíneo asociadas a los cuidados de la salud constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. La infección relacionada con catéteres vasculares es su fuente principal. Las bacterias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* spp., constituyen uno de los agentes etiológicos más frecuentes. Objetivo: evaluar la actividad inhibitoria del AP7121 sobre la adherencia de *Staphylococcus aureus* en catéteres vasculares. Se utilizó la cepa productora de *biofilm* *S. aureus* ATCC 35556 (SA). Se estimó CIM_{AP7121} para SA, se inocularon segmentos de 20 mm de catéter vascular (n = 3) con 10^4 UFC mL^{-1} de SA. Se probaron tres esquemas diferentes (A: simultáneo, B: anterior y C: después del desafío bacteriano) utilizando $1 \times CIM_{AP7121}$. Se incluyeron grupos de control en cada esquema. La CIM_{AP7121} fue 0,48 mg/L. Con los esquemas A y B se logró una reducción de 2 logaritmos que representa una disminución del 99 % de células viables. El tratamiento posterior a la exposición con AP7121 (esquema C) produjo una reducción de 1 logaritmo que representa una disminución del 90 % de células viables. Estos resultados sugieren una rápida actividad antimicrobiana de AP7121 que podría ser beneficiosa para reducir la adherencia bacteriana en catéteres vasculares.

Palabras claves: péptido antimicrobiano AP7121, catéter vascular, adhesión bacteriana, inhibición

ABSTRACT

Healthcare-associated bloodstream infections are the leading cause of morbidity and mortality in hospitalized patients. Vascular catheter-related infection is its main source. Gram-positive bacteria, mainly *Staphylococcus* spp., are the most prevalent etiological agents. Our aim was to assess the inhibitory activity of the AP7121 on the *Staphylococcus aureus* adherence in vascular catheters. The biofilm-producer strain *S. aureus* ATCC 35556 (SA) was used. MIC_{AP7121} for SA was performed using 20 mm segments of the vascular catheter (n = 3) were inoculated with 10^4 UFC mL^{-1} of SA. Three different treatment schemes (A: simultaneous, B: previous, and C: following bacterial challenge) using $1 \times MIC_{AP7121}$ were tested. Control groups were included in each scheme. The MIC_{AP7121}

was 0.48 mg/L. A reduction of $2\log_{10}$ representing a decrease of 99 % of viable SA cells was achieved with schemes A and B. The post-challenge treatment with AP7121 (scheme C) produced a reduction of $1\log_{10}$ representing a 90 % decrease of viable SA cells. The results observed in this work suggest an AP7121 fast-antimicrobial activity that could be beneficial to reduce bacterial adherence on medical devices such as vascular catheters.

Keywords: antimicrobial peptide AP7121, vascular catheter, bacterial adherence, inhibition

INTRODUCCIÓN

En el mundo las infecciones sanguíneas asociadas a los cuidados de la salud constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad. Las más frecuentes son primarias y están relacionadas con los catéteres vasculares. Las bacterias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* spp., son los agentes más frecuentes (74 - 92 % del total). Las bacterias se adhieren a las superficies abióticas formando biopelículas (*biofilms*) que los preservan de la eliminación mecánica, de los antimicrobianos sistémicos y del sistema inmune del huésped.

Las biopelículas están conformadas por comunidades complejas de microorganismos que están adheridos generalmente a superficies sólidas o líquidas y embebidos en una matriz exopolisacárida y, surgen como una estrategia de supervivencia en ambientes hostiles. Las infecciones relacionadas con biopelículas tienen un significativo impacto clínico (65 - 80 % del total). Las biopelículas están implicadas en las infecciones relacionadas con el uso de dispositivos biomédicos. La inhibición de formación de biopelículas constituye la principal estrategia de prevención de bacteriemias relacionadas con catéteres intravasculares (Gahlot *et al*, 2014; Wallace *et al.*, 2017).

Actualmente los catéteres intravasculares pueden impregnarse con antibióticos para disminuir la incidencia de infecciones en pacientes críticos (Donelli y Francolini, 2001). Este uso conlleva el riesgo de inducir la emergencia de cepas multirresistentes o la infección en el paciente por bacterias resistentes al antibiótico impregnado en el catéter.

*Autor para correspondencia: **Mónica Sparo**
Correo electrónico: msparos@salud.unicen.edu.ar
Recibido: 23 de septiembre de 2022
Aceptado: 10 de marzo de 2023

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud la mayoría de las drogas en desarrollo son modificaciones de antibióticos existentes, ofreciendo beneficios a corto plazo en el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias con multirresistencia a los antimicrobianos (Inoue y Minghui, 2017). Por lo tanto, se ha prestado especial atención a la evaluación de la aplicación de péptidos antimicrobianos de origen bacteriano para la atención de pacientes, por su eficacia y velocidad bactericida *in vitro* (Cavera *et al.*, 2015; Delpech *et al.*, 2017).

Enterococcus faecalis CECT7121 (depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Burjasot, Valencia, España) es una cepa probiótica productora de un péptido antimicrobiano de 4726 Da con actividad bactericida sobre bacterias Gram positivas denominado AP7121 (Sparo *et al.*, 2006; 2009; Delpech *et al.*, 2017; Delpech *et al.*, 2019).

Previamente, se ha demostrado la actividad anti-biopelícula *in vitro* de AP7121 sobre múltiples aislamientos de origen clínico de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* multirresistentes y la prevención de formación de biopelículas por estas bacterias en una superficie abiótica (Delpech *et al.*, 2020).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad inhibitoria de adhesión bacteriana sobre catéteres intravasculares utilizados en Medicina Humana mediante experimentos de tratamiento con AP7121 previo, simultáneo o posterior al desafío con una cepa de colección internacional productora de biopelícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción del péptido AP7121

Se aisló AP7121, siguiendo la metodología descrita previamente (Sparo *et al.*, 2009). En resumen, se incubó la cepa probiótica *E. faecalis* CECT7121 a 35 ± 2 °C, durante 18 h, en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Laboratorio Britania, Buenos Aires, Argentina). Se inoculó el cultivo en 4 L de caldo BHI e incubó a 35 ± 2 °C, durante 9 h. Luego, se centrifugó a 15.000 g, a 4 °C, durante 20 min. El sobrenadante se ajustó a pH: 7,0 y se precipitó de acuerdo a Dawson *et al.* (1969). Se centrifugó a 20.000 g, a 4 °C, durante 20 min. El precipitado se re-suspendió en 40 mL de buffer fosfato salino (PBS), 5 mM, pH: 7,0. El péptido AP se aisló mediante una extracción físico-química, empleando cartuchos Sep-Pak™ C18 (Waters, Milford, EE.UU.). El extracto de *E. faecalis* (5 mL) se cargó en un cartucho, lavado previamente con acetonitrilo en ácido trifluoro acético (TFA, 0,1 %) y se eluyó con acetonitrilo (60 %)-TFA (0,1 %). El eluato se evaporó a sequedad utilizando una centrifuga de vacío (ThermoSavant Instruments, Hollbrook, EE.UU.). Se re-suspendió el precipitado en PBS (250 µL). Se inyectaron alícuotas de la suspensión (20 µL) en un sistema HPLC de fase reversa (Shimadzu, Kyoto, Japón) y se separaron en una columna Nucleosil C18 (5 µm, Pharmacia, Uppsala, Suecia). Fase móvil: buffer A (TFA 0,1 %) y buffer B (acetonitrilo 95 % en TFA 0,1 %). AP se eluyó en un gradiente lineal (95 % A/5 % B a 15 % A/85 % B), con una tasa de flujo de 0,2 mL/min, controlando la elución con un detector UV.

Se recolectaron las fracciones en periodos regulares. Se evaporó la fracción activa hasta sequedad y se re-suspendió en buffer fosfato (50 mM, pH: 7,0). Se determinó la actividad inhibitoria sobre *S. aureus* ATCC 35556 por el método de difusión en pocillos previamente descrito (Sparo *et al.*, 2009). Se detectó actividad biológica de AP7121 luego de 30 min de la inyección de la muestra, con aproximadamente 40 % de buffer B. Se determinó la concentración de AP7121 (Kit de ensayo de proteínas Pierce™ Coomassie, Thermo Scientific™). Finalmente se liofilizó hasta su posterior análisis.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM_{AP7121})

Se utilizó para el ensayo la cepa formadora de biopelícula *S. aureus* ATCC 35556, SA (Seidi *et al.*, 2008).

Se determinó la CIM_{AP7121} de SA mediante el micro-método de dilución en caldo. Brevemente, una colonia de SA (desarrollo de 18 h en agar BHI) se inoculó en caldo BHI y se incubó durante 18 h a 35 ± 2 °C. Posteriormente cada aislamiento se inoculó en un caldo BHI fresco y se incubó hasta una absorbancia de 0,05 a 595 nm de longitud de onda. Alícuotas (20 µL) de diluciones seriadas de AP7121, en un rango de 0,25 mg/L a 64 mg/L, se agregaron a cada pocillo de las placas estériles (96 pocillos) que contenía 80 µL del cultivo de cada aislamiento. Se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 h con agitación continua y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se definió la CIM como la menor concentración de AP7121 que inhibió completamente el desarrollo bacteriano. Se efectuaron tres experimentos por duplicado.

Determinación del tiempo de contacto

Se utilizaron segmentos (20 mm) de catéteres intravasculares (CV) de poliuretano (BILUM S, KFF S.A.; Argentina). Cada una de las secciones del CV se colocó en una solución de AP7121 durante 4, 2, 1 h, 30 min. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado. Cada sección del catéter se introdujo en la solución de AP7121 de forma que todas las muestras completaran su contacto requerido al mismo tiempo. Luego los segmentos se transfirieron a tubos conteniendo 10^4 UFC·mL⁻¹ de la cepa *S. aureus* ATCC 35556, siguiendo el procedimiento descrito en el Protocolo B. Se realizaron tres experimentos por duplicado.

Estudios de adhesión en catéter

Para los estudios de adhesión en CV se ensayaron tres protocolos (A, B y C).

Protocolo A = Se sumergieron 3 segmentos (20 mm) de CV en una solución de AP7121 de concentración final CIMx1 y aproximadamente 10^4 UFC·mL⁻¹ de la cepa.

Protocolo B = tres segmentos de CV se pre-incubaron durante el tiempo óptimo de contacto, establecido previamente, con una solución de AP7121 CIMx1 de concentración final y luego los segmentos se transfirieron a tubos conteniendo 10^4 UFC·mL⁻¹ de la cepa.

Protocolo C = tres segmentos de CV fueron pre-incubados con la cepa (10^4 UFC·mL⁻¹) durante 3 h, y se agregó el

AP7121 a concentraciones final de CIMx1.

Como controles en cada protocolo se agregó un grupo con CV no tratados con AP7121.

Las muestras de los protocolos A, B y C se incubaron durante 18 h a 37 °C. Posteriormente los segmentos de CV fueron lavados dos veces en BF y las bacterias fueron eliminadas mediante sonicación durante 5 min (Sonic Fisher Scientific, 500). Se determinó el número de células viables mediante recuento bacteriano en agar y se relacionó con el área de superficie del catéter. Los experimentos fueron realizados tres veces por duplicado.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como media \pm DE (desviación estándar). Los resultados se sometieron a análisis de varianza y, cuando era apropiado, a la prueba de Kruskal-Wallis para examinar la existencia de diferencias. Los valores se consideraron significativamente diferentes entre sí cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la cepa *S. aureus* ATCC 35556 se obtuvo una CIM_{AP7121} = 0,48 mg/L. El tiempo mínimo óptimo de contacto del péptido con el CV fue de 2 h ya que se observó un descenso significativo de las células viables (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación del tiempo de pre-incubación de CV con AP7121.

Table 1. Determination of CV pre-incubation time with AP7121.

Protocolo Pre-incubación (horas)	<i>S. aureus</i> Control (Log ₁₀ UFC/mm ²)	<i>S. aureus</i> + AP7121 (Log ₁₀ UFC/mm ²)	Valor de p ^a
4 h	6.42 \pm 0.08	4.31 \pm 0.09	$p < 0.001$
2 h	6.35 \pm 0.10	4.28 \pm 0.08	$p < 0.001$
1 h	6.27 \pm 0.12	5.79 \pm 0.11	$p > 0.05$
30 min	6.36 \pm 0.13	6.29 \pm 0.10	$p > 0.05$

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

^aANOVA y Kruskal-wallis test.

En relación a los estudios de adhesión al catéter, como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 1, se observó un descenso significativo de bacterias viables ($p < 0,001$) de *S. aureus* en 2 log₁₀ (99,0 % de la población) cuando se agregó el péptido con la bacteria (A) y antes (2 h) de la adhesión bacteriana (B). En el protocolo C el descenso de viables también fue significativo ($p < 0,01$) ya que el descenso de viables fue de 1 log₁₀ (90 % de la población).

Los grupos en riesgo por cateterización venosa de larga duración son los pacientes con quimioterapia, prematuros, trasplantados de precursores de células hematopoyéticas, con alimentación parenteral, dializados (Pitiriga *et al.*, 2020). En este contexto, se planteó como objetivos generales: Investigar la potencial aplicación del péptido antimicrobiano AP7121 en Medicina Humana, focalizando los estudios en la actividad inhibitoria de AP7121 sobre la adhesión de bacterias a dispositivos médicos como son los catéteres vasculares.

Hasta el momento, la investigación para el desarrollo de péptidos antimicrobianos con fines terapéuticos se ha

Tabla 2. Efecto de AP7121 sobre la adhesión a CV de *S. aureus* ATCC 35556.

Table 2. Effect of AP7121 on *S. aureus* ATCC 35556 adhesion to CV.

Protocolo	<i>S. aureus</i> Control (Log ₁₀ UFC/mm ²)	<i>S. aureus</i> + AP7121 (Log ₁₀ UFC/mm ²)	Valor de p ^a
A	6.18 \pm 0.06	4.11 \pm 0.05	$p < 0.001$
B	6.12 \pm 0.12	4.01 \pm 0.08	$p < 0.001$
C	6.31 \pm 0.11	5.27 \pm 0.13	$p < 0.01$

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

^aANOVA y Kruskal-wallis test.

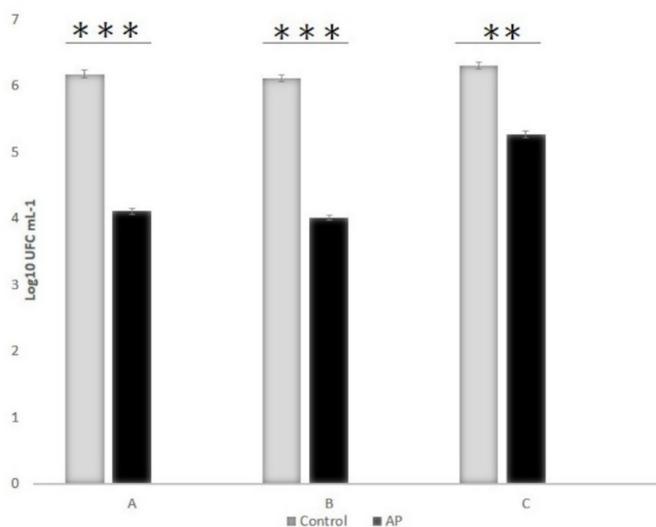


Figura 1. Efecto de AP7121 sobre la adhesión a CV de *S. aureus* ATCC 35556.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. A, B, C: Protocolo A; Protocolo B; Protocolo C.

Figure 1. Effect of AP7121 on *S. aureus* ATCC 35556 adhesion to CV.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. A, B, C: Protocol A; Protocol B; Protocol C.

enfocado en bacteriocinas como nisina, lacticina y listostafina (Hassan *et al.*, 2012). La bacteriocina más estudiada, nisina, se ha propuesto como barrera antimicrobiana porque pueden adsorberse en las superficies y prevenir la adhesión bacteriana (Bower *et al.*, 2001). De hecho, la adhesión de tres bacterias médicamente relevantes (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis*) se inhibió significativamente tubos de succión tratados con nisina (Bower *et al.*, 1998). Godoy-Santos *et al.* (2018) demostraron que la nisina producía permeabilización de la membrana de bacterias sésiles y mostró concordancia entre la pérdida de viabilidad y la pérdida de integridad de la membrana.

En ensayos *in vitro* realizados con las bacteriocinas Pep5 y epidermina se observó una disminución significativa en el número de células viables de *S. epidermidis* adheridas a catéteres intravasculares de silicona (Fontana *et al.*, 2005).

S. aureus puede formar biopelículas sobre diversos biomateriales y son responsables de infecciones recurrentes en pacientes hospitalizados por tiempo prolongado (Nan *et al.*, 2015). Las biopelículas maduras son de difícil erradicación, complicando el tratamiento del agente patógeno (Dosler y Mataraci, 2013). AP7121 impide la colonización de *S. aureus* sobre CV y por lo tanto también constituye una potencial herramienta para la prevención de infecciones por formación de biopelículas.

Este estudio mostró que AP7121 previene la colonización de *S. aureus* productor de biopelícula en una superficie inerte como son los CV. El análisis del recuento de células viables mostró diferencias significativas entre el segmento no tratado (control) y el tratado (experimental) con AP7121.

La formación de biopelículas conduce a una pobre penetración de los antimicrobianos e incrementa la farmacoresistencia, ratificando la necesidad de explorar nuevos compuestos alternativos. En este estudio se demostró que AP7121 fue eficaz en inhibición de la formación de biopelículas estafilocócicas y tuvo efectos inhibitorios y bactericidas sobre células de biopelículas ya establecidas, lo que demuestra que también fue capaz de atravesar biopelículas existentes. La actividad de AP7121 sobre las bacterias sésiles se facilita por su carácter hidrofóbico, y la producción de muerte por lisis bacteriana formando poros en la membrana (Sparo et al., 2006; 2009; Delpech et al., 2020).

Es importante destacar que en AP se ha demostrado la ausencia de efectos citotóxicos (Sparo, 2006).

CONCLUSIONES

El péptido AP7121 podría constituir una potencial herramienta para la inhibición de formación de biopelículas en CV. Los resultados preliminares obtenidos *in vitro* indican una acción rápida del péptido AP7121, sugiriendo que podría aplicarse previamente o en el momento de la colocación de catéteres vasculares y con posibilidad de aplicación sucesiva durante el uso del dispositivo médico. Sin embargo, son necesarios futuros estudios *in vivo* para validar su eficacia.

REFERENCIAS

- Bower, C.K., Bothwell, M.K. y McGuire, J. 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 22:259-265.
- Bower, C.K., Daeschel, M.A. y McGuire, J. 1998. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion. *Journal of Dairy Science*. 81:2771-2778.
- Cavera, V.L., Arthur, T.D., Kashtanov, D. y Chikindas, M.L. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46, 494-501.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th ed. CLSI Document M100. Wayne, PA: CLSI.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M. 1969. Data for Biochemical Research, Clarendon Press, p.622. Oxford.
- Delpech, G., Bistoletti, M., Ceci, M., Lissarrague, S., Bruni, S.S. y Sparo, M. 2017. Bactericidal activity and synergy studies of peptide AP-CECT7121 against multi-resistant bacteria isolated from human and animal soft-tissue infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 9: 355-362.
- Delpech, G., Ceci, M., Lissarrague, S., García Allende, L., Baldaccini, B. y Sparo, M. 2020. In vitro activity of antimicrobial peptide AP7121 against human methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilm producers. *Biofouling*. 36 (2): 257-267.
- Delpech, G., Hebert, E.M., Sparo, M. y Saavedra, L. 2019. Draft genome sequence of *Enterococcus faecalis* strain CECT7121, a corn silage isolate with antibacterial activity against Gram-positive pathogens". *Microbiology Resource Announcements*. 8:e00245-19.
- Donelli, G. y Francolini, I. 2001. Efficacy of antiadhesive, antibiotic, and antiseptic coating in preventing catheter-related infections. *Journal of Chemotherapy*. 13:56-67.
- Dosler, S. y Mataraci, E. 2013. *In vitro* pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Peptides*. 49: 53-8.
- Fontana, M.B., de Bastos Mdo, C. y Brandelli, A. 2006. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Current Microbiology*. 52(5):350-3.
- Gahlot, R., Nigam, C., Kumar, V., Yadav, G. y Anupurba, S. 2014. Catheter-related bloodstream infections. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*. 4(2):162-7.
- Godoy-Santos, F., Pitts, B., Stewart, P.S. y Mantovani, H.C. 2018. Nisin penetrates *Staphylococcus aureus* biofilms but shows differences in killing effects against sessile and planktonic cells. *Biorxiv*. 303636.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. y Lotfipour, F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113(4): 723-736.
- Inoue, H. y Minghui, R. 2017. Resistencia a los antimicrobianos: del compromiso político a la acción nacional. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*. 95: 242.
- Nan, L., Yang, K. y Ren, G. 2015. Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. *Material Science and Engineering C*. 51: 356-61.
- Pitiriga, V., Kanellopoulos, P., Bakalis, I., Kampos, E., Sagris, I., Saroglous, G. y Tsakris, A. 2020. Central venous catheter-related bloodstream infection and colonization: the impact of insertion site and distribution of multidrug-resistant pathogens. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 9: 189-197.
- Programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina. (2017). Estudio nacional de diagnóstico institucional y prevalencia de infecciones asociadas al cuidado de la salud de hospitales de Argentina. Disponible en: www.vihda.com.ar.
- Seidi, K., Stucki, M., Ruegg, M., Goerke, C., Wolz, C. y Harris, L. 2008. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infection and Immunity*. 76: 2044-2050.
- Sherertz, R.J., Raad, I., Belani, A., Koo, L.C., Rand, K.H., Pickett, D.L., Straub, S.A. y Fauerbach, L.L. 1990. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 76-82.
- Sparo, M.D., Castro, M.S., Andino, P.J., Lavigne, M.V., Ceriani, C., Gutiérrez, G.L., Fernández, M.M., De Marzi, M.C., Malchiodi, E.L. y Manghi, M.A. 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 123-134.
- Sparo, M.D., Jones, D.G. y Sánchez Bruni, S.F. 2009. Assessment of the *in vitro* efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human Gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy*. 55: 270-7.
- Sparo, M. 2006. Investigación de bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas en el Partido de Tandil. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Wallace, A., Albadawi, H., Patel, N., Khademhosseini, A., Zhang, Y. S., Naidu, S. y Oklu, R. 2017. Anti-fouling strategies for central venous catheters. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 7(Suppl 3): S246.