

Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* como biopelículas en superficies inertes

Castrillón-Rivera LE¹, Palma-Ramos A¹, Monroy-García A¹, Castañeda-Sánchez JI¹, Padilla-Desgarenes MC²

Resumen

ANTECEDENTES: las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización de los microorganismos; éstas son ubicuas en la naturaleza y son responsables de muchas enfermedades. Estas comunidades están embebidas en una matriz extracelular autoproducida principalmente de exopolisacáridos. Las biopelículas se unen irreversiblemente a superficies inertes o a tejidos vivos. Su formación ocurre como un proceso continuo que sigue varias etapas de desarrollo. Las biopelículas están presentes en varios tejidos, incluida la piel, interfieren con la curación de las heridas y se asocian con diversas enfermedades, como dermatitis atópica, acné vulgar, candidiasis, impétigo ampolloso y pénfigo foliáceo, entre otras. El actinomicetoma es un proceso infeccioso de la piel causado por *Nocardia brasiliensis*, los granos que se forman *in vivo* consisten en un cemento de unión de naturaleza polisacáridica que amalgama a estas bacterias; este componente puede representar la asociación microbiana como biopelícula en esta enfermedad.

OBJETIVO: obtener biopelículas de *Nocardia brasiliensis* crecida en diferentes superficies de acetatos y en catéteres.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio experimental, descriptivo y observacional en el que se realizó una curva de crecimiento de la cepa de referencia de *Nocardia brasiliensis* CECT3032 en medio Sabouraud. Se utilizaron como superficies inertes placas de cultivo de 24 pozos y acetatos de 1x1 cm de las marcas comerciales Apollo, PCM y Kronalíne, así como catéteres de 0.2, 0.5 y 1 cm de diámetro. Se inocularon con 200x10⁶ UFC/mL durante 50 días, las lecturas se realizaron cada tercer día durante la primera semana y una vez semanalmente hasta completar los 50 días de crecimiento. Se cuantificaron las UFC/mL y la biopelícula se observó mediante análisis microscópico y por las lecturas del extracto de ácido acético obtenido después de la tinción con cristal violeta.

RESULTADOS: se logró obtener el crecimiento de *N. brasiliensis* como biopelículas sobre acetatos, por lo que se propone como un posible modelo de estudio en el laboratorio. Del crecimiento de *Nocardia brasiliensis* con formación de biopelícula en catéteres se logró obtener diferencias entre los materiales utilizados; el catéter de 0.6 cm de grosor con 1 cm de largo (con balón para angioplastia coronaria transluminal percutánea) favoreció el mayor crecimiento. Asimismo, el aumento en el diámetro se reflejó en el número de UFC/mL recuperado.

CONCLUSIÓN: *Nocardia brasiliensis* tiene la capacidad de formar biopelículas *in vitro* en acetatos y catéteres y puede considerarse un factor de riesgo para la manipulación clínica.

PALABRAS CLAVE: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia*, biopelículas.

EAU THERMALE
Avène

¹ Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

² Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

Recibido: octubre 2015

Aceptado: enero 2016

Correspondencia

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera
Laboratorio de Inmunología, UIDIS
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Calzada del Hueso 1100
04960 Ciudad de México
lcrivera@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como

Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Monroy-García A, Castañeda-Sánchez JI, Padilla-Desgarenes MC. Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* como biopelículas en superficies inertes. Dermatol Rev Mex. 2016 mayo;60(3):210-218.

Dermatol Rev Mex 2016 May;60(3):210-218.

***Nocardia brasiliensis* biofilms growing on inert surfaces.**

Castrillón-Rivera LE¹, Palma-Ramos A¹, Monroy-García A¹, Castañeda-Sánchez JI¹, Padilla-Desgarennes MC²



Abstract

BACKGROUND: Biofilms are microbial communities that are the most successful colonization of microorganisms, are ubiquitous in nature and responsible for many diseases. These communities embedded in an extracellular matrix growing inside self-produced exopolysaccharide and attached irreversibly to an inert surface or a living tissue. Biofilm formation occurs as a continuous process with various stages of development. Biofilms are present in various tissues including skin, interfering with the wound healing and associated with various diseases such as atopic dermatitis, acne, candidiasis, bullous impetigo and pemphigus foliaceus, among others. Actinomycetoma is an infectious process of the skin caused by *Nocardia brasiliensis*, the grains are formed in vivo consisting of a polysaccharide bonding cement which amalgamates these bacteria, this component may represent the association as microbial biofilm in this condition.

OBJECTIVE: To obtain *Nocardia brasiliensis* biofilms growing in different inert surfaces such as acetates and catheters.

MATERIAL AND METHOD: An experimental, descriptive and observational study was made to develop the growth curve of the reference strain CECT3032 of *N. brasiliensis* in Sabouraud medium. As inert surfaces 24 culture plates and 1x1 cm acetates trademarks Apollo, PCM and Kronaline catheters and 0.2, 0.5 and 1 cm diameter were used. These materials were inoculated with 200×10^6 CFU/mL for 50 days and readings were taken every other day for the first week and once weekly to complete 50 days of growth. CFUs/mL were measured and the biofilm was observed by microscopic analysis readings of acetic acid extract obtained after crystal violet staining.

RESULTS: It is possible to obtain the growth of biofilms on *N. brasiliensis* as acetates proposing as a possible model for study in the laboratory. *Nocardia brasiliensis* growth in catheters form BP was able to obtain differences between the materials used being the catheter 0.6 cm thick 1 cm in length (balloon for percutaneous transluminal coronary angioplasty) which favored further growth. Moreover the increase in the diameter reflected in the number of CFU/mL recovered.

CONCLUSION: *Nocardia brasiliensis* has the ability to form biofilms in vitro acetates and catheters and can be considered a risk factor for clinical handling.

KEYWORDS: *Nocardia brasiliensis*; *Nocardia*; biofilms

¹ Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

² Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

Correspondence

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera
Laboratorio de Inmunología, UIDIS
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Calzada del Hueso 1100
04960 Ciudad de México
lcrivera@correo.xoc.uam.mx

EAU THERMALE
Avène

ANTECEDENTES

En condiciones de abundancia nutricional y sin estrés químico o físico, una bacteria u hongo prolifera a su máxima tasa de crecimiento como organismo planctónico (libre); sin embargo, si el microorganismo detecta cualquier estrés nutricional o ambiental y si encuentra una superficie acondicionada con moléculas orgánicas, se une irreversiblemente a ésta;^{1,2} las células se dividen y colonizan la superficie y cuando la concentración de señales químicas producidas por el metabolismo microbiano alcanza un nivel umbral, esta densidad poblacional inicia cambios fenotípicos en su población³ que la llevan a la expresión de nuevas proteínas de señalización,⁴ conocidas como *quorum sensing*,⁵ lo que resulta en la síntesis y secreción de una sustancia polimérica extracelular (matriz) compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que actúan como una especie de goma que hace que las bacterias o levaduras sésiles (adheridas) se unan firmemente a la superficie con lo que se forman microcolonias estructuradas conocidas como biopelículas, mismas que pueden unirse a superficies inertes o tejidos vivos.⁶ Esta matriz permite la interconexión de las células inmovilizadas y actúa como un sistema digestivo externo que mantiene a las enzimas extracelulares cercanas a las células y que las capacita para que metabolicen biopolímeros sólidos y coloidales.⁷⁻⁹

Las biopelículas ocurren como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo, que son: *a)* acondicionamiento, *b)* adhesión, *c)* síntesis de matriz extracelular, *d)* maduración y *e)* dispersión, lo que lleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeados de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento del agua.¹⁰ Esta asociación microbiana se vincula con varias enfermedades, como fibrosis quística, endocar-

ditis, otitis media, prostatitis crónica, así como en enfermedades nosocomiales derivadas de dispositivos médicos infectados e implantes.¹¹ En el caso de la piel, las biopelículas se asocian con diversas enfermedades, como dermatitis atópica, acné, candidiasis, impétigo ampolloso y pénfigo foliáceo, entre otras.¹² Es importante conocer el complejo ecosistema de la microflora de la piel para entender su papel en la protección contra otras infecciones, así como su participación en diversas enfermedades de origen no infeccioso; de ahí el interés por entender la posible asociación de los microorganismos residentes y la posibilidad que ellos se organicen como biopelículas.¹³

Varios son los problemas derivados de la existencia de biopelículas en la práctica médica, como la interferencia en la curación de las heridas o en la resistencia a los antibióticos,¹⁴⁻¹⁶ de ahí la importancia del conocimiento y control de esta forma de organización microbiana.

El actinomicetoma consiste en una infección granulomatosa crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar huesos. Se distingue por el aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas a través de las que se eliminan pus y granos, constituidos por filamentos bacterianos. En México, los principales agentes causales son *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*.¹⁷

La matriz extracelular en las biopelículas, además de ser un componente de resistencia al ambiente externo, también puede ser un factor de virulencia, como en el caso del cemento de unión presente en los granos de actinomicetos de *Nocardia* y *Actinomadura*,¹⁸ que se ha caracterizado como un polisacárido neutro en el caso de *Nocardia* y un polisacárido ácido sulfatado para *Actinomadura*.¹⁹ Estos microorganismos son las principales bacterias filamentosas responsables de la enfermedad conocida como



actinomicetoma; sin embargo, el papel que juega este polisacárido en la patología de esta enfermedad aún se desconoce; por esta razón es importante contar con modelos experimentales que favorezcan la producción de estas sustancias y una posibilidad podría ser la generación de biopelículas por estas bacterias.

Los primeros estudios reportados con la intención de obtener biopelículas de *Nocardia brasiliensis* *in vitro* como posible modelo experimental consistieron en analizar las fases iniciales de formación sobre acetatos y plásticos al estudiar la adherencia y homogeneidad del crecimiento como biopelículas con diferencias de acuerdo con el material analizado.²⁰

El objetivo de este estudio fue obtener la cinética de crecimiento de biopelículas de la cepa de referencia CECT3032 de *Nocardia brasiliensis* sobre diferentes superficies (acetatos), así como su obtención en catéteres.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio experimental, descriptivo y observacional en el que se utilizaron: a) acetatos de 1x1 cm de diferentes marcas comerciales: Apollo, PCM y Kronalin-E, en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos y b) catéteres: de 1 cm de largo y diferentes diámetros y materiales, como equipo de adaptación al vacío para extracción de sangre Becton Dickinson Vacutainer de 0.1 cm de grosor y 1 cm de diámetro, catéteres con balón para angioplastia coronaria transluminal percutánea de 0.4 y 0.6 cm de grosor.

Microorganismo: cepa de referencia CECT3032 de *Nocardia brasiliensis*.

Métodos:

- a) Pruebas de identificación de la cepa de referencia CECT3032: se realizó la iden-

tificación morfológica en crecimiento en medio dextrosa-Sabouraud, así como la hidrólisis de caseína.

- b) Curva de crecimiento en caldo Dextrosa-Sabouraud: se sembraron 5 mL de la bacteria ajustada al tubo núm. 2 del nefelómetro de McFarland (600×10^6 UFC/mL) en 150 mL del medio de cultivo y se realizó la lectura espectrofotométrica a 540 nm (tiempo 0) y se tomaron alícuotas de 3 mL cada 12 horas durante 15 días. Cada muestra se sembró en agar dextrosa-Sabouraud para la cuantificación de microorganismos.

- C) Formación de biopelículas:

Inóculo: a cada pozo de la placa de cultivo se colocaron los materiales de estudio previamente esterilizados y se depositaron 2 mL de una suspensión de *N. brasiliensis* de una suspensión de 600×10^6 UFC/mL, la placa se incubó a 37°C en cámara húmeda y en agitación constante; a los ocho días se cambió el medio de cultivo y se tomaron muestras a partir de los 15 días cada semana hasta alcanzar el día 50.

Tratamiento de las muestras: para evaluar el crecimiento como biopelícula de *N. brasiliensis* se extrajo el medio líquido de cada pozo y se removieron cuidadosamente los acetatos y catéteres que se enjuagaron con solución salina estéril para analizar únicamente los microorganismos adheridos al material, mismos que se removieron y cuantificaron por la lectura a 540 nm asociados con la curva de crecimiento previamente obtenida.

Para analizar la existencia de microorganismos adheridos, éstos se fijaron con 100 µL de metanol a 99%, se secó la muestra y posteriormente se agregaron 100 µL de cristal violeta (1%) durante 20 minutos y se enjuagó cada material con agua destilada para remover el exceso de colorante. Se adicionaron 150 µL de ácido acético a 33%

EAU THERMALE
Avène

para realizar la lectura espectrofotométrica (600 nm) del extracto para la demostración indirecta de la existencia de polisacáridos.²¹

RESULTADOS

Identificación de la cepa de referencia

El crecimiento característico de *N. brasiliensis* de colonias blanco-amarillentas, plegadas o de aspecto yesoso en el medio de dextrosa-Sabouraud se muestra en la Figura 1. La prueba bioquímica de la hidrólisis de caseína fue positiva al aclarar la zona de crecimiento por el consumo de la caseína.

La curva de crecimiento se obtuvo de la cuenta de UFC/mL correspondientes a las de las diluciones preparadas a partir del crecimiento de *N. brasiliensis* en caldo dextrosa-Sabouraud ajustada al tubo 2 del nefelómetro de McFarland, así como de la lectura espectrofotométrica correspondiente a la densidad óptica (absorbancia) a 540 nm de estas mismas diluciones (Figuras 2 y 3).

Las lecturas en densidad óptica permiten relacionar el crecimiento bacteriano en UFC/mL, por lo

que éste fue el método utilizado para el análisis del crecimiento a partir del caldo de cultivo.

Formación de biopelículas

En el crecimiento como biopelícula sobre acetatos se aprecia que en el día 29 en todos los casos se logró el crecimiento confluyente sobre el material de estudio (Figura 4).

La cuantificación por UFC/mL obtenidas del material recuperado del acetato se muestra en el Cuadro 1. En ambos ensayos se demuestra que existen diferencias en el tiempo de formación de biopelículas en función del material utilizado. También se observa que el máximo de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre estos soportes inertes ocurre en diferentes tiempos, la marca Apollo favorece más este tipo de crecimiento con valores elevados a partir del día 20 (2×10^6 UFC/mL) y un máximo el día 29 de su crecimiento (4×10^6 UFC/mL), a diferencia del acetato Kronalin E que alcanzó un máximo de crecimiento al día 29 (1×10^6 UFC/mL) y PCM donde se recupera el mayor número bacteriano hasta el día 43 (4×10^6 UFC/mL).

La determinación del crecimiento se realizó por la cuantificación de densidad óptica a 540 nm.

Formación de biopelículas en catéteres

Se logró determinar la presencia de biopelículas de *Nocardia* sobre (y entre) el material de los diversos catéteres evaluados (Figura 5) y la recuperación de bacterias a partir de estos materiales (Cuadro 2).

La determinación del crecimiento se realizó por la cuantificación de densidad óptica a 540 nm.

Con estos resultados se demuestra que no se logró obtener crecimiento en todas las muestras; sin embargo, se observó una relación directa del



Figura 1. Colonia de *N. brasiliensis* de la cepa de referencia CECT3032 crecida en agar dextrosa-Sabouraud.

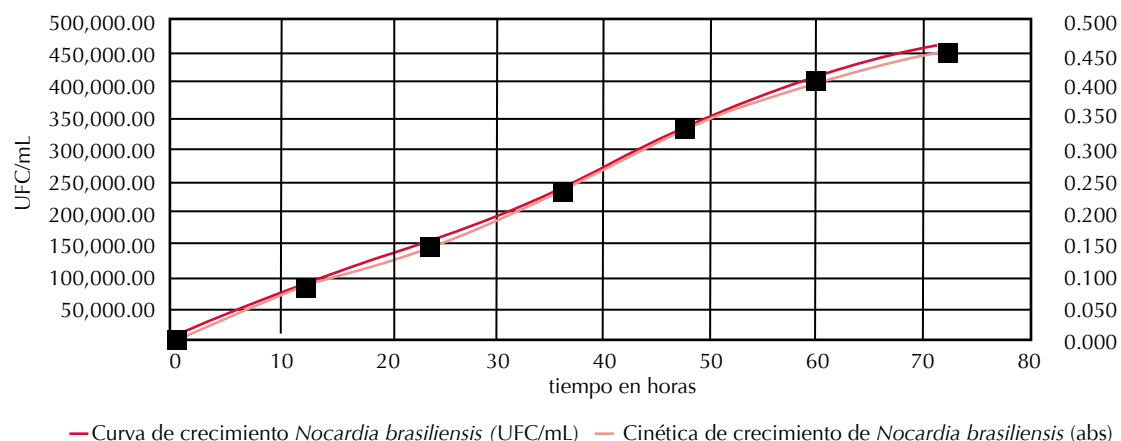


Figura 2. Determinación de la curva de crecimiento de la cepa de referencia CECT3032 de *N. brasiliensis* mediante la determinación de UFC/mL y la cinética de crecimiento mediante la lectura de la densidad óptica a 540 nm.

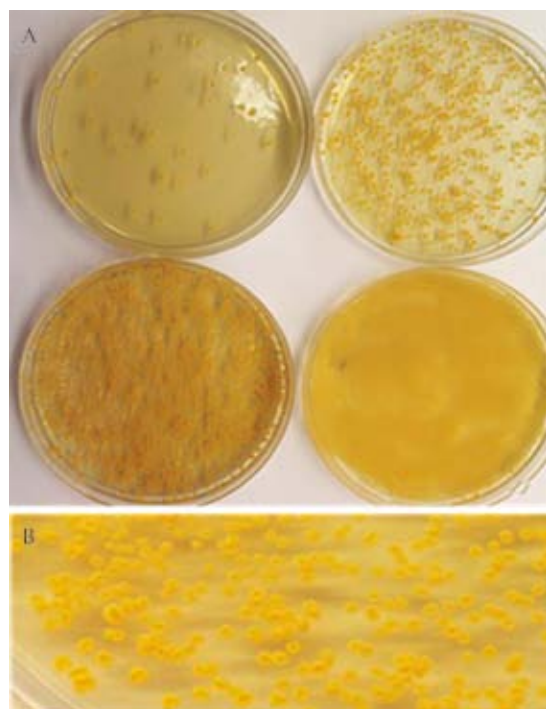


Figura 3. A. Determinación de las UFC/mL de la cepa de referencia CECT3032 de *N. brasiliensis*. B. Acercamiento de las colonias.

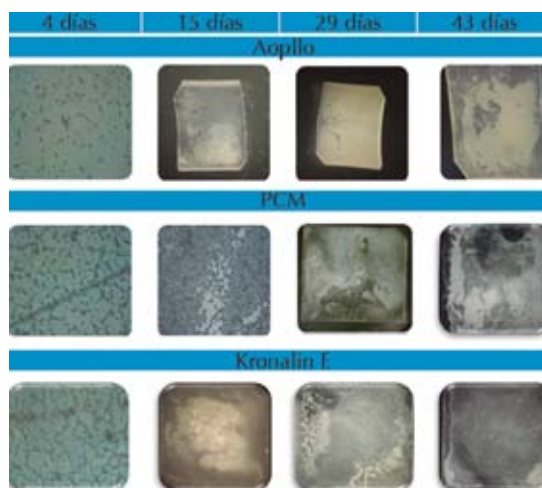


Figura 4. Apreciación microscópica de las biopelículas de *N. brasiliensis* CECT3032 sobre acetatos a diferentes tiempos de crecimiento.

número de bacterias recuperadas de acuerdo con el grosor del catéter, así como con el tiempo de exposición a *Nocardia*.

Los resultados de la cuantificación del extracto de ácido acético proveniente de los acetatos y

EAU THERMALE
Avène

Cuadro 1. Cinética de crecimiento de biopelículas de *N. brasiliensis* CECT3032 sobre acetatos

Tiempo (días)	Apollo (UFC/mL)	PCM (UFC/mL)	Kronalin E (UFC/mL)
3	1x10 ⁵	-	-
4	-	2x10 ⁵	-
5	1x10 ⁵	-	3x10 ⁵
6	1x10 ⁵	-	4x10 ⁵
7	-	3x10 ⁵	-
10	-	3x10 ⁵	-
15	2x10 ⁵	-	4x10 ⁵
20	2x10 ⁶	-	-
29	4x10 ⁶	6x10 ⁵	1x10 ⁶
36	-	6x10 ⁵	6x10 ⁵
43	2x10 ⁶	4x10 ⁶	8x10 ⁵

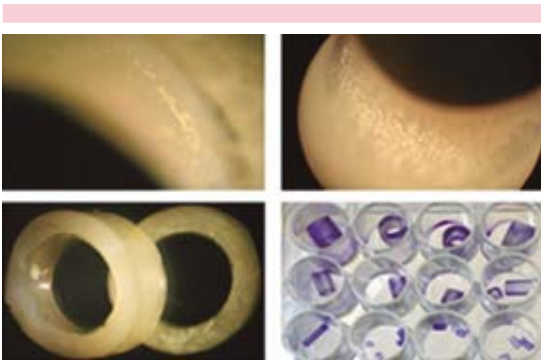


Figura 5. Formación de biopelículas de *N. brasiliensis* en catéteres. Se observa el crecimiento de la bacteria y la apariencia de los catéteres después del tratamiento con cristal violeta.

catéteres mostraron gran variabilidad sin lograr aún una correlación directa con la formación de biopelículas mediante la formación de polisacárido, por lo que aún se requiere mayor estandarización de esta técnica para tener resultados concluyentes.

DISCUSIÓN

En general, a las bacterias se les describe como patógenos que flotan libremente y manifiestan su patogenicidad como individuos; sin embargo, actualmente debe reconocerse su asociación en

consorcios multicelulares conocidos como biopelículas. Esta organización microbiana ayuda a la supervivencia de los microorganismos, proporcionándoles protección contra las defensas del hospedero y mecanismos de erradicación microbiana; éstas tienen la capacidad de formar colonias que se adhieren a diferentes superficies vivas o inertes.

La matriz extracelular es la característica que determina a una biopelículas y está compuesta principalmente de un exopolisacárido característico de cada especie microbiana, agua y en menor proporción, proteínas, lípidos y ADN extracelular (ADNe). Esta matriz facilita la adherencia a superficies y sirve como protección a los mecanismos de defensa del hospedero al secuestrar mediadores inmunológicos, como anticuerpos, factores del complemento y citocinas, y evitar el reconocimiento de opsoninas y, por tanto, el reconocimiento y eliminación por células fagocíticas.

Se estima que alrededor de 70% de las infecciones bacterianas humanas en el mundo son provocadas por biopelículas, entre estas enfermedades están la prostatitis, enfermedades renales, caries dental, periodontitis, otitis media, endocarditis, neumonía, infecciones nosocomiales y trastornos asociados con el implante

Cuadro 2. Cuantificación de UFC/mL a partir de catéteres de diferente grosor incubados con *N. brasiliensis* a diferentes días de crecimiento

Tiempo (días)	Vacutainer Grosor 0.1 cm	Catéter para angioplastia Grosor 0.4 cm	Catéter para angioplastia Grosor 0.6 cm
3	1x10 ⁵	4x10 ⁵	1x10 ⁶
4	-	6x10 ⁵	1x10 ⁶
5	-	7x10 ⁵	-
6	2x10 ⁵	-	2x10 ⁶
7	2x10 ⁵	-	-
10	2x10 ⁵	7x10 ⁵	-
15	3x10 ⁵	-	-
20	-	-	3x10 ⁶
29	-	8x10 ⁵	-



de articulaciones artificiales, catéteres y otros dispositivos médicos.²²

Varias son las asociaciones de las biopelículas en Dermatología; tal es el caso de la dermatitis atópica en pacientes colonizados por *S. aureus*, cuya erradicación ha sido difícil con los tratamientos convencionales cuando se ha demostrado la existencia como biopelícula de esta bacteria. En 2005 se publicó un estudio acerca del efecto del farnesol y xilitol en la inducción y eliminación de estas biopelículas con resultados favorables.²³

En el caso de candidiasis se reportó la participación de la adherencia a mucosas en la patogénesis con alteración de la respuesta inmunitaria local y su integridad, incluso se sugiere este tipo de asociación en su forma comensal. La candidiasis orofaríngea, pseudomembranosa aguda y crónica atrófica (estomatitis por la dentadura) son algunas manifestaciones clínicas de *Candida* organizada como biopelícula.²⁴

El acné vulgar y la foliculitis son otras afecciones asociadas significativamente con poblaciones de microcolonias-biopelículas de *Propionibacterium acnes*, que inducen respuesta inflamatoria local –creando quistes, pápulas y cicatrices–, implicada en la naturaleza crónica de estas enfermedades.^{25,26}

Las biopelículas de *S. aureus* se han descrito en muestras de impétigo ampolloso y pénfigo foliáceo, mientras que la asociación de esta bacteria con *Streptococcus pyogenes* se ha reportado en impétigo no ampolloso.²⁷

El objetivo de este estudio fue encontrar el material que favorece la adhesión de *Nocardia brasiliensis*, porque se ha encontrado que las propiedades físico-químicas de las superficies ejercen gran influencia en la adhesión de los microorganismos.²¹ Los resultados demuestran

que *Nocardia brasiliensis* tiene mayor afinidad hacia las superficies hidrófobas no polarizadas, como los plásticos, lo que resulta en la adhesión en todos los materiales probados, aunque, en acetatos de la marca PCM y Kronalin-E mostraron mayor adherencia de *Nocardia brasiliensis* y en poco tiempo; el catéter con mejor adaptación y adherencia de *Nocardia brasiliensis* fue el catéter de 0.6 cm de grosor y 1 cm de largo, con balón para angioplastia coronaria transluminal percutánea.

Es importante reconocer la capacidad de *Nocardia brasiliensis* para formar biopelículas *in vitro* en acetatos y catéteres, en el primer caso puede servir como modelo de estudio en el laboratorio y en el segundo puede considerarse un factor de riesgo en la manipulación clínica de pacientes, como se ha demostrado con otros patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia liquefacies*, *Candida parapsilopsis*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.²⁸⁻³⁰

Por último, debe reconocerse que la asociación microbiana como biopelículas es un factor de virulencia que puede participar en el origen de la cronicidad de muchas infecciones dermatológicas por la capacidad de resistencia a los mecanismos inmunitarios y a los tratamientos con antimicrobianos.

CONCLUSIÓN

Nocardia brasiliensis tiene la capacidad de formar biopelículas *in vitro* en acetatos y catéteres y puede considerarse un factor de riesgo en la manipulación clínica.

REFERENCIAS

1. Phillips P, Sampson E, Yang Q, Antonelli P. Bacterial biofilms in wounds. Wound Healing Southern Africa 2008;1:10-12.
2. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Biopelículas fúngicas. Dermatol Rev Mex 2013;57:350-361.

EAU THERMALE Avène

3. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 2002;184:1140-1154.
4. Keller L, Surette GM. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol 2006;4:249-258.
5. Lazarella BA. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. Curr Op Microbiol 2000;3:177-182.
6. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 2000;54:49-79.
7. Sutherland WI. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001;147:14-24.
8. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. Dermatol Rev Mex 2010;54:14-24.
9. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nature Rev Microbiol 2010;8:623-633.
10. Betancourth M, Botero JE, Rivera SP. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colomb Med 2004;35(Supl. 1):34-39.
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318-1322.
12. Nusbaum AG, Kirsner SR, Charles AC. Biofilms in dermatology. Skin Ther Letter 2012;17:7.
13. Percival LS, Emanuel Ch, Cutting FK, Williams WD. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. Int Wound J 2011;9:14-32.
14. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005;13:34-40.
15. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Interferencia de las biopelículas en el proceso de curación de heridas. Dermatol Rev Mex 2011;55:127-139.
16. Castrillón L, Palma R. Biofilm: A survival and resistance mechanism of microorganism. In: Antibiotic resistant bacteria. A continuous challenge in the new millennium. Pana M, editor. In Tech 2012;7:159-178.
17. López MR, Méndez TLJ, Bonifaz A, Arenas R y col. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. Gac Méd Méx 2013;149:586-592.
18. Palma RA, Castrillón RL, Padilla-Desgarenes MC. Avances en el estudio de la relación huésped-parásito en infecciones por *Actinomadura*. Dermatología 2006;19:35-42.
19. Palma RA, Castrillón RL, Padilla D MC. Caracterización histoquímica de micetomas por *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis*. Dermatol Rev Mex 2005;49:51-58.
20. Castrillón-Rivera LE, Espinosa-Antunez VK, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Capacidad adherente de *Nocardia brasiliensis* superficies inertes como fase inicial de la formación de biopelículas. Dermatol Rev Mex 2011;55:17-23.
21. Adetunji OV, Tajudeen OI. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on wood, steel and glass surfaces. Global Veterinaria 2011;6:6-10.
22. Costerton JW. Microbial biofilms. Rev Microbiol 1995;49:711-745.
23. Katsuyama M, Ichikawa H, Ogawa S. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm *Staphylococcus aureus* without antibiotics. J Dermatol Sci 2005;38:197-205.
24. Chandra J, Kuhn MD, Mukherjee KP, Hoyer LL, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001;183:5385-5394.
25. Jahns AC, Lundskog B, Ganceviciene R, Palmer RH, et al. An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study. BJD 2012;1-9.
26. Coenye T, Honraet K, Rossel B, Neils HJ. Biofilms in skin infections: *Propionibacterium acnes* and acne vulgaris. Infectious Disorders Drug Targets 2008;8:156-159.
27. Akiyama H, Hamada T, Huh WK. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. BJD 2003;148:526-532.
28. Renk H, Neunhoffer F, Hölzl F, Hofbeck M, Kumpf M. *Enterococcus faecium* mediastinitis complicated by disseminated *Candida* parapsilosis infection after congenital heart surgery in a 4-week-old baby. Case Rep Infect Dis 2015;543685.
29. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans*. Biofilms and human disease. Annu Rev Microbiol 2015;69:71-92.
30. Beltrame CO, Côrtes MF, Bonelli RR, Côrrea AB, et al. Inactivation of the autolysis-related genes *lrgB* and *yycI* in *Staphylococcus aureus* increases cell lysis-dependent eDNA release and enhances biofilm development *in vitro* and *in vivo*. PLoS One 2015;10:e0138924.