

Estandarización de un ensayo de adhesión de *Escherichia coli* para el cribado de agentes antibiopelículas

Standardization of an *Escherichia coli* adhesion assay for anti-biofilm agents screening

Mercyleidi Díaz-Reyes¹ <https://orcid.org/0000-0002-7131-8468>

Mailyln Perez-Llanes¹ <https://orcid.org/0000-0003-0663-1199>

Odalys Blanco-Hidalgo¹ <https://orcid.org/0000-0002-8947-9251>

Ivette Espinosa-Castaño^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8932-7047>

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

*Autor para la correspondencia: espinosa@censa.edu.cu

RESUMEN

Introducción: Las biopelículas constituyen un factor clave en el desarrollo de enfermedades infecciosas y la resistencia a fármacos para su control. Nuevas estrategias terapéuticas incluyen productos naturales como agentes antibiopelículas. Sin embargo, la comparación de los resultados suele ser difícil debido a la falta de homogeneidad y estandarización en los métodos empleados para estudiar la formación de biopelículas *in vitro*.

Objetivo: Estandarizar un ensayo de adhesión en microplaca de *Escherichia coli* para su uso en el cribado de potenciales agentes antibiopelículas.

Métodos: Se utilizó el método de adherencia en microplaca y la tinción con violeta cristal. Se evaluó la influencia de condiciones experimentales como la concentración bacteriana, el medio de cultivo y el tiempo de incubación.

Resultados: Se identificaron como condiciones óptimas para la formación de biopelículas: el medio Luria Bertani (LB), la concentración bacteriana a 10^5 UFC/mL y un tiempo de incubación de 24 h.

Conclusiones: Los resultados mostraron que las condiciones de cultivo influyen en la formación de biopelículas. Se determinaron las condiciones de cultivo óptimas para la formación de biopelículas de *E. coli*, que podrían emplearse en futuros estudios acerca del efecto de productos naturales sobre la inhibición o destrucción de biopelículas.

Palabras clave: biopelículas; *Escherichia coli*; estandarización.

ABSTRACT

Introduction: Biofilms are a key factor in the development of infectious diseases and drug resistance for their control. New therapeutic strategies include natural products as anti-biofilm agents. However, comparing results is often difficult due to the lack of homogeneity and standardization of the methods used to study biofilm formation in vitro.

Objective: To standardize an *Escherichia coli* microplate adhesion assay for potential anti-biofilm agents screening.

Methods: The microplate adhesion method and crystal violet staining were used. The influence of experimental conditions such as bacterial concentration, culture medium, and incubation time were evaluated.

Results: Optimal conditions for biofilm formation included: Luria Bertani (LB) medium, bacterial concentration at 10^5 CFU/mL, and an incubation time of 24 hours.

Conclusions: The results showed that culture conditions influence biofilm formation. Optimal culture conditions for the formation of *E. coli* biofilms were determined, which could be used in further studies on the effect of natural products on the inhibition or destruction of biofilms.

Keywords: biofilms; *Escherichia coli*; standardization.

Recibido: 08/03/2022

Aceptado: 21/03/2022

Introducción

Las biopelículas son comunidades de una o varias especies de bacterias adheridas a un sustrato que se encuentran embebidas en una matriz extracelular.⁽¹⁾ La estructura de la biopelícula le confiere resistencia a las bacterias frente a antimicrobianos.⁽²⁾ Entre los

mecanismos responsables de la resistencia están los siguientes: la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos; el crecimiento ralentizado de las bacterias de la biopelícula debido a la limitación de nutrientes; la existencia de microambientes que antagonizan con la acción de los antimicrobianos y la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria.⁽³⁾ Además, pueden evadir de manera parcial o total la respuesta inmunitaria del huésped, pues se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmunitario a las bacterias.⁽⁴⁾

Las infecciones relacionadas con biopelículas, característicamente infecciones crónicas persistentes refractarias a tratamiento antimicrobiano, son un importante problema sanitario, ya que representan entre un 65-80 % de todas las infecciones.⁽⁵⁾ *Escherichia coli* es frecuentemente aislada en infecciones nosocomiales. Algunas cepas hipermutables de *E. coli* han estado implicadas en infecciones del tracto urinario y pulmonares de pacientes con fibrosis quística.^(6,7) Además, el surgimiento y diseminación de genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos en estas especies son particularmente preocupantes.⁽⁸⁾

Los estudios clásicos de sensibilidad a los antimicrobianos se realizan con bacterias en estado planctónico. Por lo tanto, en general, los resultados de las pruebas de sensibilidad clásicas pueden no ser extrapolables a infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. En los últimos años se han implementado y probado diferentes modelos de desarrollo de biopelículas *in vitro*.⁽⁹⁾ Sin embargo, la falta de estandarización de los métodos, parámetros e interpretación de los resultados limita la aplicación de los datos obtenidos en el entorno clínico, incluyendo la comparación de diferentes estrategias de tratamiento.^(9,10)

La escasa eficacia de los distintos tratamientos y la toxicidad *in vivo* de los antibióticos disponibles impulsan a los investigadores hacia el descubrimiento de productos naturales antibiopelículas, pues son más eficaces que sus homólogos de síntesis química y tienen menos efectos secundarios.⁽¹¹⁾ El objetivo de este trabajo fue estandarizar un ensayo de adhesión en microplaca de *Escherichia coli* para su uso en el cribado de potenciales agentes antibiopelículas.

Métodos

Se realizó un estudio comparativo para evaluar la adherencia de *E. coli* a placas considerando las variables siguientes: concentración bacteriana, tipo de medio de cultivo y tiempo de incubación.

La cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se cultivó en placas de agar triptona soya (BIOCEN, Cuba), suplementado con un 5 % de sangre de cordero, a 37 °C durante 24 h. A partir de este cultivo se inocularon cinco colonias de *E. coli* en tubos con 5 mL de medio Luria Bertani (LB) (BIOCEN, Cuba) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La concentración de los cultivos se ajustó a 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL (según datos de densidad óptica (DO) a 620 nm y conteo de UFC en placas). La capacidad de formación de biopelículas se evaluó con el método de adhesión en microplaca propuesto por Naves y otros,⁽¹²⁾ con algunas modificaciones.

A partir de una suspensión de la bacteria ajustada a 1×10^8 UFC/mL se realizaron diluciones seriadas 1:10 en NaCl al 0,9 % (en el rango 10^8 - 10^4 UFC/mL). En una microplaca de 96 pocillos no tratada para cultivo celular y de fondo plano (COSTAR, EE. UU.), se añadieron por pocillo 150 µL de cada medio: medio mínimo M9 suplementado con 8 g/L de glucosa y medio LB, seguidamente 50 µL de cada concentración bacteriana. Se incubaron en condiciones estáticas a 37 °C durante 24 y 48 horas.

El control negativo correspondió a cada uno de los medios de cultivo sin inocular. Luego de la incubación, los medios de cultivo se retiraron y se lavaron los pocillos con 150 µL de agua destilada, y después se secaron a 60 °C durante una hora en el horno (Hotpack, EE. UU.). La tinción de los pocillos se realizó con 150 µL de violeta cristal (Sigma-Aldrich, EE. UU.) al 1 % durante 10 min.⁽¹³⁾ Seguidamente se retiró el colorante y se lavaron los pocillos cuatro veces con 150 µL de agua destilada y se secaron durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 200 µL de ácido acético (FLUKA, EE. UU.) al 33 % y se midió la DO a una longitud de onda de 530 nm en lector de microplacas (SUMA, PR-621, Cuba).

Se emplearon los datos de $DO_{530 \text{ nm}}$ y las ecuaciones siguientes:⁽¹⁴⁾

$$DO_c = c + 3 \times DE_c$$

$$DO_a = m - DO_c$$

donde DO_c : valor de corte; c : promedio de la DO del control negativo; DE_c : desviación estándar del control negativo; DO_a : densidad óptica ajustada; m : promedio de la DO de la muestra.

Según los valores de corte y de DO ajustada obtenidos en el procedimiento anterior, la capacidad de producción de biopelículas se clasificó en cuatro grupos diferentes como indica la tabla 1.⁽¹⁵⁾

Tabla 1 - Clasificación según la capacidad de producción de biopelículas

Valores	Clasificación
$DO_a \geq 4DO_c$	Fuertemente productora (FP)
$2DO_c < DO_a \leq 4DO_c$	Moderadamente productora (MP)
$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	Débilmente productora (DP)
$DO_a \leq DO_c$	No productora (NP)

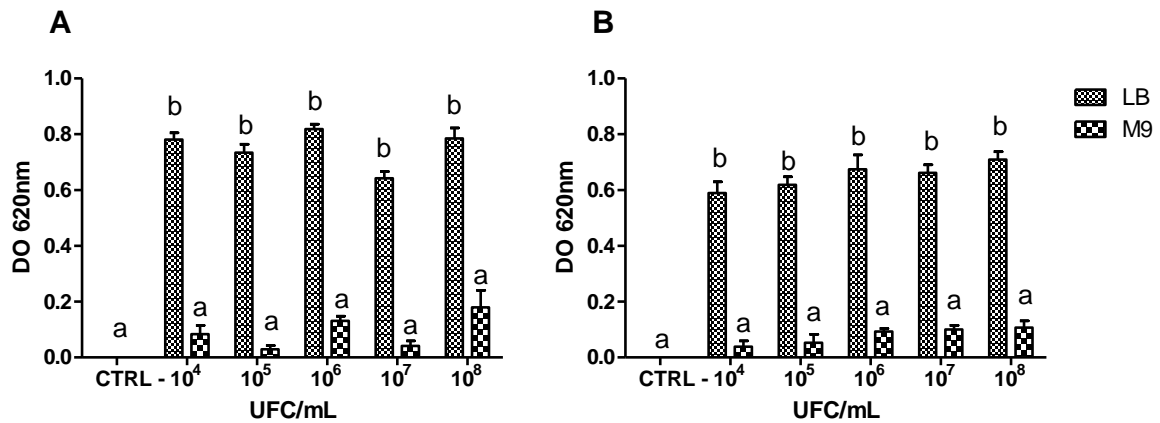
Legenda: DO_c : valor de corte; DO_a : densidad óptica ajustada.

Una vez clasificada cada una de las condiciones estudiadas, se escogió como condición óptima aquella en que *E. coli* mostró el mayor valor de DO_a y por tanto se clasificó como fuertemente productora.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó con el *software* GraphPad Prism versión 5. Para evaluar la significación de las diferencias entre las concentraciones bacterianas, los medios LB y M9 y entre los dos periodos de incubación se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Las medias se compararon mediante la prueba de comparación múltiple de Dunn con una probabilidad de error del 5 % ($p < 0,05$).

Resultados

En la figura 1 se observa que los máximos valores de crecimiento planctónico de *E. coli* se obtuvieron en el medio LB a las 24 horas (Fig. A) y ocurrió una disminución a las 48 h (Fig. B). La carga inicial no influyó en los valores de DO alcanzados en cada combinación.



Leyenda: CTRL-: control negativo; DO620 nm de medio no inoculado.

Fig. - Crecimiento planctónico a partir de diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonia de *E. coli* a las 24 (A) y 48 (B) horas de incubación en dos medios de cultivo diferentes.

El crecimiento planctónico de las bacterias se expresó mediante los valores de DO a 620 nm.

Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis y las medias se compararon mediante la prueba de comparación múltiple de Dunn. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Las condiciones evaluadas: dos tiempos de incubación, dos medios de cultivo y cinco concentraciones de UFC/mL de la bacteria, resultaron en 20 combinaciones. En cuanto a la capacidad de producción de biopelículas, 5 de estas combinaciones fueron clasificadas como fuertemente productoras, una moderadamente productora, 10 débilmente productoras y 4 no productoras de biopelículas (Tabla 2).

De manera similar a lo ocurrido en el crecimiento planctónico, las 5 concentraciones de UFC/mL de *E. coli* en el medio LB a las 24 h de incubación permitieron una fuerte producción de biopelículas obteniendo los máximos valores de DO_a; mientras que en 48 h hubo una disminución de los valores de DO_a, por lo que se obtuvo una débil producción de biopelículas. La utilización del medio de cultivo M9 mostró generalmente una capacidad débilmente productora o no productora de biopelículas. Por ello, se obtuvieron mejores resultados con el empleo del medio LB y un tiempo de 24 h de incubación. En el medio LB, las concentraciones bacterianas 10⁷ y 10⁸ UFC/mL tuvieron los menores valores de DO_a. Mientras las concentraciones 10⁴, 10⁵ y 10⁶ UFC/mL alcanzaron valores superiores, pero similares entre ellas, por lo que podría usarse cualquiera de estas concentraciones. Sin embargo, se escogió 10⁵ UFC/mL por tener el mayor valor de DO_a.

Por tanto, se identificaron como condiciones óptimas para la formación de biopelículas: el medio LB, la concentración bacteriana 10^5 UFC/mL y un tiempo de incubación de 24 h.

Tabla 2 - Valores de DO_a obtenidos en el ensayo de adherencia para diferentes concentraciones de *E. coli* cultivadas en dos medios de cultivo y con dos tiempos de incubación diferentes

Concentración (UFC/mL)	Medio de cultivo	Tiempo (horas)	DO_c	DO_a	Clasificación	
10^4	LB	24	0,047	0,590	$DO_a \geq 4DO_c$	FP
		48	0,098	0,123	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
	M9	24	0,076	0,135	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
		48	0,086	0,081	$DO_a \leq DO_c$	NP
10^5	LB	24	0,047	0,606	$DO_a \geq 4DO_c$	FP
		48	0,098	0,113	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
	M9	24	0,076	0,126	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
		48	0,086	0,102	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
10^6	LB	24	0,047	0,584	$DO_a \geq 4DO_c$	FP
		48	0,098	0,119	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
	M9	24	0,076	0,139	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
		48	0,086	0,098	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
10^7	LB	24	0,047	0,403	$DO_a \geq 4DO_c$	FP
		48	0,098	0,088	$DO_a \leq DO_c$	NP
	M9	24	0,076	0,055	$DO_a \leq DO_c$	NP
		48	0,086	0,026	$DO_a \leq DO_c$	NP
10^8	LB	24	0,047	0,371	$DO_a \geq 4DO_c$	FP
		48	0,098	0,147	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP
	M9	24	0,076	0,187	$2DO_c < DO_a \leq 4DO_c$	MP
		48	0,086	0,098	$DO_c < DO_a \leq 2DO_c$	DP

Leyenda: DO_c : valor de corte; DO_a : densidad óptica ajustada; FP: fuertemente productora; MP: moderadamente productora; DP: débilmente productora; NP: no Productora; LB: medio Luria Bertani; M9: medio mínimo M9.

Discusión

El desarrollo de estrategias fiables contra las biopelículas depende en gran medida de que se comprendan claramente los mecanismos que subyacen al desarrollo de la biopelícula. Existen varios métodos de detección de biopelículas, sin embargo, la falta de estandarización sigue siendo un punto ciego en la comunidad de las biopelículas. La búsqueda de la estandarización es problemática, ya que las biopelículas son estructuras vivas, es decir, complejas y dinámicas. La estructura y las propiedades de la biopelícula dependen en gran medida del entorno de crecimiento. En general, las condiciones de

crecimiento actúan sobre el comportamiento biológico y físico de las bacterias en función de su potencial de supervivencia.⁽¹⁶⁾ La comparación entre los resultados publicados en la literatura suele ser difícil, debido al uso de diferentes aproximaciones estandarizadas, técnicas de preparación de inóculos, tamaño del inóculo, medio de crecimiento y condiciones de incubación. Los criterios empleados para definir la formación de biopelículas varían considerablemente de un estudio a otro.⁽¹⁷⁾

Se han descrito varios métodos de ensayo para la cuantificación de biopelículas en placas de microtitulación. El método de adhesión en microplaca combinado con la tinción con violeta cristal es el procedimiento más común para evaluar la formación de biopelículas. El violeta cristal es un colorante básico que se une a las moléculas cargadas negativamente en la matriz extracelular. Este ensayo se ha empleado debido a su facilidad de uso y la adaptabilidad del protocolo a una variedad de aplicaciones.⁽¹⁸⁾

Como se ha establecido, la interpretación de los resultados obtenidos de DO_{530 nm} requiere la definición de un valor de corte (DO_c) que distinga las cepas productoras de biopelículas de las no productoras. Algunos investigadores determinan este valor umbral sobre la base de tres veces la desviación estándar por encima del valor de DO del medio no inoculado (control negativo)⁽¹⁹⁾ o del valor alcanzado por una cepa control no productora de biopelículas.⁽²⁰⁾ Otros investigadores usan valores de corte predefinidos 0,1;⁽²¹⁾ 0,12⁽²²⁾ o 0,2.⁽²³⁾ En algunos estudios el resultado de la cepa control positivo se usó como punto de partida para el cálculo,⁽²⁴⁾ mientras que en otros, una cepa se consideró formadora de biopelículas si su DO fue dos veces mayor que la DO de la cepa control negativo utilizada.⁽²⁵⁾ El uso de cepas como controles negativos o positivos, como referencia para los cálculos, puede dar lugar a ciertas incoherencias debido a numerosos factores que influyen en la producción de biopelículas. Por eso, los autores de este estudio consideran que la mejor opción para la interpretación de los resultados es el uso del control negativo (medio de cultivo) como punto de partida para todos los cálculos.

Las condiciones ambientales, incluyendo el medio de cultivo y los nutrientes disponibles, pueden modular la producción de biopelículas microbianas y su función. Tienen un gran impacto en el crecimiento y desarrollo de la biopelícula y la actividad metabólica de las células que la componen.⁽²⁶⁾ Incluso se ha sugerido que la composición del medio es el factor más importante que influye en la capacidad de las bacterias para producir biopelículas en condiciones *in vitro*.⁽²⁷⁾

Algunos autores han descrito una intensa formación de biopelículas para cepas de *E. coli* en medios ricos, como LB, y una baja formación en caldos mínimos suplementados con

una única fuente de carbono como glucosa o glicerol,⁽²⁸⁾ lo cual coincide con los resultados de este estudio. Sin embargo, otros autores han descrito una mayor producción de biopelículas en medios mínimos, teniendo como estímulo la escasez de nutrientes en el medio,⁽²⁹⁾ sugiriendo que diferencias en la metodología influyen en el comportamiento de las cepas estudiadas.

La formación de biopelículas es una estrategia de sobrevivencia, que incrementa la transición de la bacteria de un modo de vida planctónico a una condición sésil, en un ambiente generalmente limitado nutricionalmente; pues al colonizar la superficie, la bacteria captura nutrientes absorbidos sobre esta. Sin embargo, en medios ricos en nutrientes las proteínas se adhieren a la superficie, afectando la adherencia de la bacteria. En este estudio el LB es un medio rico en proteínas que permitió la mayor adherencia de la bacteria.

Estudios dirigidos a determinar la concentración adecuada de bacterias para la formación de biopelículas han mostrado resultados semejantes a los de esta investigación. *Palanisamy* y otros determinaron que varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formaron biopelículas a la concentración de 10^3 UFC/mL,⁽³⁰⁾ mientras que *Leon* y *Bojacá* identificaron 10^4 UFC/mL como la mejor concentración para las bacterias: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*.⁽³¹⁾

Según los datos disponibles, el tiempo de incubación también desempeña un papel crucial en el desarrollo de la biopelícula.⁽³²⁾ Habitualmente, se utilizan distintos tiempos de incubación para los ensayos de formación de biopelículas en condiciones estáticas, que varían desde 24 h hasta 5 días o más.⁽³³⁾ Al igual que en este estudio, también se detectó una reducción de biomasa de 24 a 48 h en biopelículas formadas por *Gardnerella vaginalis*.⁽³⁴⁾ Esto sugiere que el agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos de desecho, con el tiempo, podría afectar la formación de biopelículas. El protocolo de 24 h es ampliamente recomendado, ya que se ha usado en la gran mayoría de los estudios con biopelículas.^(21,23)

Sin embargo, una limitación del ensayo estandarizado en microplacas con tinción con violeta cristal en este estudio es la incapacidad de distinguir entre poblaciones bacterianas vivas y muertas. Este problema contribuye a una gran variabilidad entre las muestras y puede complicar la interpretación de los resultados del cribado de moléculas con acción antibiopelículas.

Conclusiones

Los resultados indican que la formación de biopelículas de *E. coli in vitro* depende de las condiciones experimentales. Aunque el medio LB permitió la mayor producción de biopelículas, el estudio también reveló que este proceso se ve influenciado por otras condiciones como la concentración bacteriana y el tiempo de incubación. Las condiciones de cultivo identificadas podrían emplearse en estudios adicionales sobre el potencial efecto de productos naturales sobre la inhibición o destrucción de biopelículas.

Referencias bibliográficas

1. Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):276-301. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fux010>
2. Letsididi KS, Lou Z, Letsididi R, Mohammed K, Maguy BL. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. *Lebenson Wiss Technol.* 2018;94:25-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.018>
3. Dieltjens L, Appermans K, Lissens M, Lories B, Kim W, Van der Eycken EV, *et al.* Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat Commun.* 2020;11(1):107. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13660-x>
4. Watters C, Fleming D, Bishop D, Rumbaugh KP. Host responses to biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016;142:193-239. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.007>
5. Macià MD, del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl).* 2018;36(6):375-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimce.2017.04.015>
6. Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A, Duriez P, Hilali F, Amorin C, *et al.* High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol.* 2002;184(2):605-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.2.605-609.2002>
7. Crémet L, Caroff N, Giraudeau C, Reynaud A, Caillon J, Corvec S. Detection of clonally related *Escherichia coli* isolates producing different CMY β -lactamases from a cystic fibrosis patient. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):1032-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks520>

8. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23(4):320-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/qco.0b013e3283398dc1>
9. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):981-90. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
10. Malone M, Goeres DM, Gosbell I, Vickery K, Jensen S, Stoodley P. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(2):147-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1262257>
11. Mishra R, Panda AK, De Mandal S, Shakeel M, Bisht SS, Khan J. Natural anti-biofilm agents: Strategies to control biofilm-forming pathogens. *Front Microbiol*. 2020;11:566325. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.566325>
12. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, *et al*. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol*. 2008;105(2):585-90. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x>
13. Doll K, Jongsthaphongpun KL, Stumpp NS, Winkel A, Stiesch M. Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J Microbiol Methods*. 2016;130:61-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.016>
14. Gómez J, Gómez-Lus ML, Bas P, Ramos C, Caini F, Maestre JR. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Española de Quimioterapia*. 2013;26(2).
15. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, *et al*. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*. 2007;115(8):891-9. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
16. Boudarel H, Mathias J-D, Blaysat B, Grédiac M. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2018;4(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41522-018-0062-5>
17. Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, *et al*. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagn*

- Microbiol Infect Dis. 2013;75(3):252-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.019>
18. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, *et al.* Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(3):313-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
19. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, *et al.* Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22(6):996-1006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
20. Mulder JG, Degener JE. Slime-producing properties of coagulase-negative *staphylococci* isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 1998;4(12):689-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.1998.tb00653.x>
21. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 2003;92(1-2):179-85. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00360-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00360-7)
22. Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, Donati ME, Pirini V, Gamberini S, *et al.* Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mater Res A.* 2006;76(2):425-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30552>
23. Møretrø T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *staphylococci* from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5648-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.9.5648-5655.2003>
24. Allignet J, Galdbart J-O, Morvan A, Dyke KGH, Vaudaux P, Aubert S, *et al.* Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. *Microbiology.* 1999;145(Pt 8)(8):2033-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-145-8-2033>
25. Fowler VG Jr, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesion locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol.* 2001;189(3):127-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s430-001-8018-5>

26. Tan Y, Leonhard M, Schneider-Stickler B. Evaluation of culture conditions for mixed biofilm formation with clinically isolated *non-albicans Candida* species and *Staphylococcus epidermidis* on silicone. *Microb Pathog.* 2017;112:215-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.002>
27. Bogut A, Magryś A. Analysis of the bacterial biofilm formation in different models of the *in vitro* culture. *Eur J Clin Exp Med.* 2021;19(1):40-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.15584/ejcem.2021.1.6>
28. Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology.* 2011;149(3):262-8.
29. Skyberg JA, Siek KE, Doetkott C, Nolan LK. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Appl Microbiol.* 2007;102(2):548-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03076.x>
30. Palanisamy NK, Ferina N, Amirulhusni AN, Mohd-Zain Z, Hussaini J, Ping LJ, *et al.* Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnology.* 2014;12(1):2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-12-2>
31. Leon Torres LA, Bojaca Lopez VC. Evaluación de la actividad anti-biofilm de nanoparticulas de plata. Cundinamarca: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2016.
32. Singh AK, Prakash P, Achra A, Singh GP, Das A, Singh RK. Standardization and Classification of *in vitro* Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis.* 2017;9(3):93-101. DOI: http://dx.doi.org/10.4103/jgid.jgid_91_16
33. Cáceres ME, Etcheverría AI, Padola NL. Efectos del medio de cultivo y de la metodología aplicada sobre la formación de biopelículas de 2 cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51(3):208-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.007>
34. Machado D, Palmeira-de-Oliveira A, Cerca N. Optimization of culture conditions for *Gardnerella vaginalis* biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2015;118:143-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.007>

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Mercyleidi Díaz Reyes, Odalys Blanco Hidalgo, Ivette Espinosa Castaño.

Curación de datos: Mercyleidi Díaz Reyes.

Análisis formal: Mercyleidi Díaz Reyes, Mailyn Perez Llanes.

Investigación: Mercyleidi Díaz Reyes.

Metodología: Mercyleidi Díaz Reyes, Odalys Blanco Hidalgo.

Redacción - borrador original: Mercyleidi Díaz Reyes, Mailyn Perez Llanes.

Redacción - revisión y edición: Mercyleidi Díaz Reyes, Mailyn Perez Llanes, Odalys Blanco Hidalgo, Ivette Espinosa Castaño.