

ARTÍCULO ORIGINAL

## Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba

Joan Peña, Odalys Uffo

Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: [joan@censa.edu.cu](mailto:joan@censa.edu.cu)

**RESUMEN:** *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más importante de la mastitis bovina. La producción de biofilme por parte de las bacterias asociadas a las infecciones intramamarias, les confiere mayor capacidad de colonizar el tejido y de protección contra el sistema inmune y contra la acción de antimicrobianos. En este estudio, se trabajó con 98 aislados cubanos de *S. aureus*, previamente genotipados para la región X de la proteína A, colectados de cinco provincias de Cuba y se testaron para la producción de *slime* y biofilme. Se observó que el 98% de los aislados tuvieron algún tipo de producción de biofilme. Se considera que el método por tinción con Violeta Cristal utilizando placas de poliestireno es el método de elección, pues el método de producción de *slime* por siembra en medio con Rojo Congo no fue adecuado para inferir producción de biofilme por la aparición de gran cantidad de falsos negativos. Se determinó además que el genotipo t605 está asociado a la alta producción de biofilme, por lo que presenta un mayor potencial patogénico.

**Palabras clave:** biofilme, *slime*, *Staphylococcus aureus*, mastitis bovina, genotipo Spa.

---

### Biofilm production of *Staphylococcus aureus* genotypes isolated from bovine mastitis in Cuba

**ABSTRACT:** *Staphylococcus aureus* is one of the major causes of bovine mastitis. Biofilm production by intramammary pathogens provides microorganisms a higher capacity to colonize the host tissue and protection against the host immune system and the protective action against antimicrobial agents. In this study, 98 *S. aureus* isolates were collected from five Cuban provinces; all isolates were tested for slime and biofilm formation, and the genetic background related to the polymorphic X-region of protein A was recorded. A high percent (98%) of Cuban isolates presented some biofilm production. These results suggest that microplate by Crystal Violet staining method for biofilm detection is the election method, since slime methodology by inoculation in Red Congo Medium is not useful for inferring biofilm production, due to a high false negative number of strains found. It was determined that t605 genotype it is associated to a high biofilm production, then a greater pathogenic potential should be expected.

**Key words:** biofilm, *slime*, *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, Spa genotype.

---

### INTRODUCCIÓN

La mastitis es la enfermedad más importante en la producción lechera, provocada mayormente por infecciones clínicas o subclínicas que deterioran la salud y bienestar animal; suele estar acompañada del decrecimiento de la producción de leche, incremento de los costos por asistencia médica, alto índice de descarte y algunas veces incluso, la muerte de la vaca.

A pesar de los esfuerzos por reducir la incidencia de mastitis, aún sigue siendo alta la prevalencia de mastitis subclínica y crónica, aunque se han logrado disminuir los casos de mastitis clínica (1).

*Staphylococcus aureus* es una causa común de infecciones intramamarias (IIM) en vacas lecheras a nivel mundial; frecuentemente conduce a mastitis crónica, además la infección por este agente es muy difícil de erradicar con terapia antibiótica (2).

En Cuba, estudios recientes señalan una prevalencia de *S. aureus* del 11.8% (3). Aunque la prevalencia de *S. aureus* ha disminuido casi tres veces en los últimos 11 años (4,5) y la etiología de la mastitis en Cuba ha cambiado en cuanto al orden de prevalencia de los agentes (3), *S. aureus* se mantiene como el patógeno de mayor predominio entre los patógenos de importancia clínica relevante.

En su infección en glándula mamaria, *S. aureus* se localiza fundamentalmente dentro de los alveolos y conductos lácteos en forma de conglomerados y en asociación con el tejido epitelial e invadiendo el tejido intersticial (1). Estos conglomerados corresponden a un crecimiento bacteriano en forma de colonias adherentes rodeadas por una matriz de exopolisacáridos cuya estructura completa constituye el biofilme, mientras que a la capa extracelular más próxima a la célula se le llama *slime* (6).

Debido al tamaño del agregado y a la presencia de los exopolímeros, las bacterias embebidas en biofilmes se encuentran protegidas de componentes del sistema inmune hospedero, entre ellos de la actividad fagocítica por macrófagos, la acción de opsoninas y de la actividad bactericida por neutrófilos (7). Por otra parte, se ha comprobado que las bacterias en este estado se vuelven hasta mil veces más resistentes a los efectos de antibióticos, comparado con las bacterias plactónicas (1,8,9).

Varios mecanismos son los responsables de la resistencia del biofilme ante los agentes antimicrobianos, entre ellos: penetración reducida de los agentes antimicrobianos a través de la matriz del biofilme, la alteración de la tasa de crecimiento de la bacteria en el biofilme y cambios fisiológicos que dan lugar a células persistentes (1).

La habilidad de *S. aureus* de formar biofilme *in vivo* se considera uno de los factores de virulencia, principales influyentes en su patogénesis en la mastitis, una vez que posibilita una mejor colonización del tejido hospedero, además de las ventajas anteriormente señaladas (10). Sin embargo, las vías regulatorias para la formación de biofilme varían entre cepas (1), por lo que resulta interesante saber si las diferencias de expresión resultante entre cepas se pueden atribuir a diferentes genotipos.

Teniendo en cuenta la importancia de *S. aureus* como agente etiológico de la mastitis y que no se conocen datos acerca la producción de biofilme por este agente en Cuba, el objetivo principal en el presente estudio es caracterizar cepas cubanas *S. aureus* en cuanto a la producción de biofilmes y relacionar dicha habilidad con los genotipos existentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de *S. aureus*

Se estudiaron 98 aislados de *S. aureus* de un cepario conformado entre 2008 y 2011 en el CENLAC (Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de los Alimentos), provenientes de leche de vacas con mastitis y leche de tanque, pertenecientes a 31 vaquerías en total, las cuales se ubicaban en seis provincias de Cuba. Los aislados estaban clasificados genéticamente en cuanto al polimorfismo del gen que codifica para la proteína A de *S. aureus*. Estuvieron disponibles 17 genotipos: t008, t1190, t1234, t127, t224, t267, t2802, t359, t4173, t518, t521, t524, t527, t605, t7136, t7750 y t9638.

### Ensayo en placa para producción de biofilme

La cuantificación de la formación de biofilme en superficie abiótica fue evaluado según el método descrito por Milanov (2), con modificaciones. Para la preparación del inóculo, todas las cepas de *S. aureus* se multiplicaron en cultivo puro en Agar Sangre durante 24 horas, a 37°C. Se inoculó una colonia en 3ml de Caldo Triptona Soya (BioCen) con 1% de Glucosa (CTSG) y se incubaron por 24 horas a 37°C; luego se realizó una dilución 1:40 en medio fresco CTSG. Se tomaron alícuotas de 200µl de la suspensión de cada aislado de *S. aureus* y se inocularon individualmente por triplicado en pocillos de placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (GreinerBio-one, Frickenhausen, Germany). Se incluyeron tres pocillos con CTSG en cada placa como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, el contenido se removió utilizando una pipeta y los pocillos se enjuagaron tres veces con Solución Peptona Bufferada; las placas se secaron en posición invertida. Para fijar las bacterias adheridas se incubó la placa a 65°C, por una hora. La tinción se realizó con 160µl de una solución al 0.5% de Violeta Cristal (Crystal Violet, Sigma). A los 15 minutos se enjuagó la placa con agua hasta eliminar todo exceso de tinción. La decoloración se realizó añadiendo 160µl de una solución de metanol 10% y ácido acético 7.5%. La densidad óptica (DO) se midió a 492 nm en un espectrofotómetro (SUMA, PR-621, Cuba), el valor de DO se considera proporcional a la formación de biomasa o cantidad de biofilme. El experimento se repitió tres veces. Se incluyó como control positivo la cepa *S. aureus* ATCC6539 (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

El valor de corte por DO (DOc) se definió como el valor de la media del blanco más tres desviaciones

estándar por encima de la misma, por tanto las cepas se clasificaron como sigue:

- no productoras de biofilme ( $DO \leq DOc$ );
- débiles productoras de biofilme ( $DOc < DO \leq 2x DOc$ );
- productoras moderadas de biofilme ( $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ );
- fuerte productora de biofilme ( $4x DOc < DO$ ).

### Producción de *slime*

La producción de *slime* en todos los aislados se evaluó por el método de Agar Rojo Congo (ARC), de acuerdo con la metodología descrita por Mariana (14). El medio fue preparado con Base de Agar Sangre (BioCen) 40g/l, Glucosa (BioCen) 10g/l y Rojo Congo (Sigma) 0.4g/l. Se inocularon las cepas en el medio y se incubó en condiciones aeróbicas, por 24 horas a 37°C, seguido de un mantenimiento a temperatura ambiente por 48 horas. Se utilizó *S. aureus* ATCC6539 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) como control positivo. El resultado positivo se corresponde con colonias negras de consistencia cristalina seca. El análisis se repitió tres veces.

### Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se empleó el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se utilizó la prueba Chi cuadrado y el Análisis de Varianza simple. La significación estadística se consideró con un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

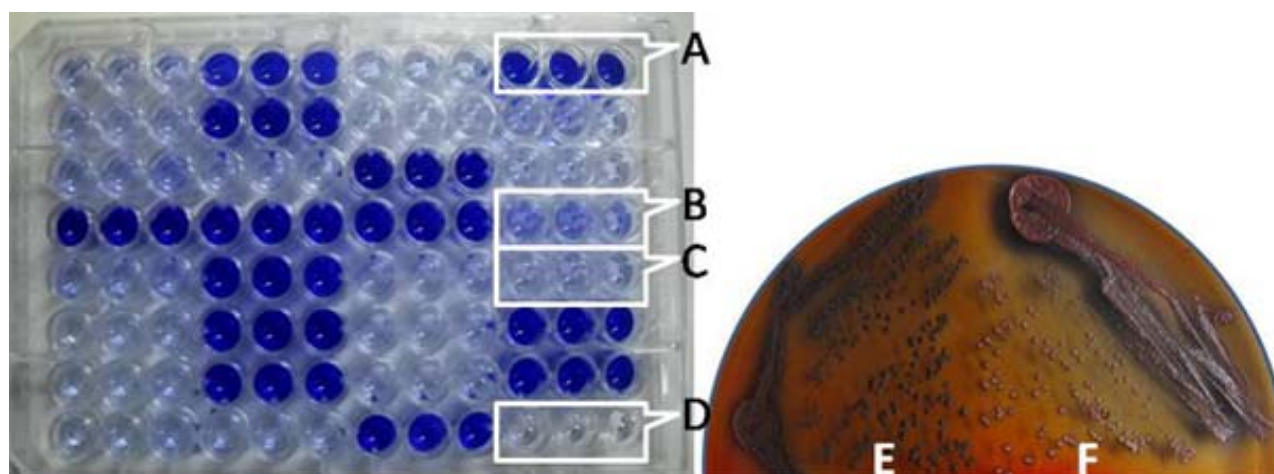
El 98% (96/98) de los aislados de *S. aureus* resultaron productores de biofilme. Teniendo en cuenta las intensidades para producir biofilme, se obtuvo que el 40,8% (40/98), 23.5% (23/98), 33.7% (33/98) y 2% (2/98) de las cepas fueron fuertes, moderadas, débiles y no productoras, respectivamente.

De la evaluación de la producción de *slime* mediante el método de siembra en Agar Rojo Congo se obtuvo que el 43.8% de las cepas producen el exopolisacárido, según la coloración de la colonia en el medio de cultivo (Figura 1).

Los dos métodos utilizados en el presente estudio se compararon en su capacidad de detectar la producción de biofilme, tomando como referencia el método de placa de poliestireno por tinción con Violeta cristal (PVC) (Tabla 1).

La comparación de ambos métodos demostró diferencias significativas. Sólo una parte de las bacterias que producen biofilme se detectan como formadoras de *slime* (44,8%) y la mayoría de los aislados de ese grupo producen biofilme con fuerte intensidad (88.3%).

El 80.4% y 100% de los aislados pertenecientes a los genotipos t605 y t7750, respectivamente, se destacan por los valores máximos de producción fuerte de biofilme dentro de cada genotipo (Tabla 2), aunque el último valor no es válido estadísticamente, por contar con solo un aislado representativo del genotipo.



**FIGURA 1.** Representación de la detección de biofilme y *slime*. En placa de poliestireno, A: cepa alta productora, B: Moderada, C: Débil y D: no productora de biofilme. En Agar Rojo Congo, E: positivo a *slime* y F: negativo a *slime*./ Representation of biofilm and slime detection. On polystyrene plate, A: high, B: moderate, C: weak and D: non biofilm producer strain. On Red Congo Agar, E: positive and F: negative to slime.

**TABLA 1.** Comparación entre el ensayo por placa de 96 pocillos (PVC) y el ensayo ARC./ *Comparison between polystyrene Cristal Violet assay and Red Congo agar for biofilm formation.*

Número de aislados de <i>S. aureus</i>	PVC positivos	PVC negativos
ARC positivos	43 (38 Fuertes, 5 Moderados)	0
ARC negativos	53 (5 Fuertes, 21 Moderados, 27 Débiles)	2
Indicadores evaluados para ARC:		
Exactitud relativa= 45.9%	Especificidad relativa= 100%	VPP= 100%
	Sensibilidad relativa= 44.8%	VPN= 3.6%

Los datos entre paréntesis representan el desglose de la intensidad de producción de biofilme, según el método de referencia PVC.

**TABLA 2.** Tipo de producción de biofilme según el genotipo Spa./ *Type of biofilm production for each Spa genotype.*

		Genotipo Spa													Total	
		t008 t1190	t1234 t527 t9638	t127	t224 t359	t267	t2802	t4173	t518	t521	t524	t605	t7136	t7750		
Producción biofilme	F	Recuento	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	37	0	1	40
		% en Spa	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	80.4	0.0	100.0	40.8
	M	Recuento	1	1	1	0	1	2	1	1	4	3	5	0	0	23
		% en Spa	33.3	50.0	25.0	0.0	16.7	40.0	100.0	25.0	57.1	60.0	10.9	0.0	0.0	23.5
	D	Recuento	2	1	3	3	4	2	0	2	3	2	3	1	0	33
		% en Spa	66.7	50.0	75.0	100.0	66.7	40.0	0.0	50.0	42.9	40.0	6.5	100.0	0.0	33.7
N	Recuento	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	
	% en Spa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	2.0	
Total	Recuento	3	2	4	3	6	5	1	4	7	5	46	1	1	98	
	% en Spa	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	

Los genotipos que están en la misma columna tienen la misma distribución. La clasificación de la producción de biofilme: F (fuerte), M (moderada), D (débil) y N (no productor).

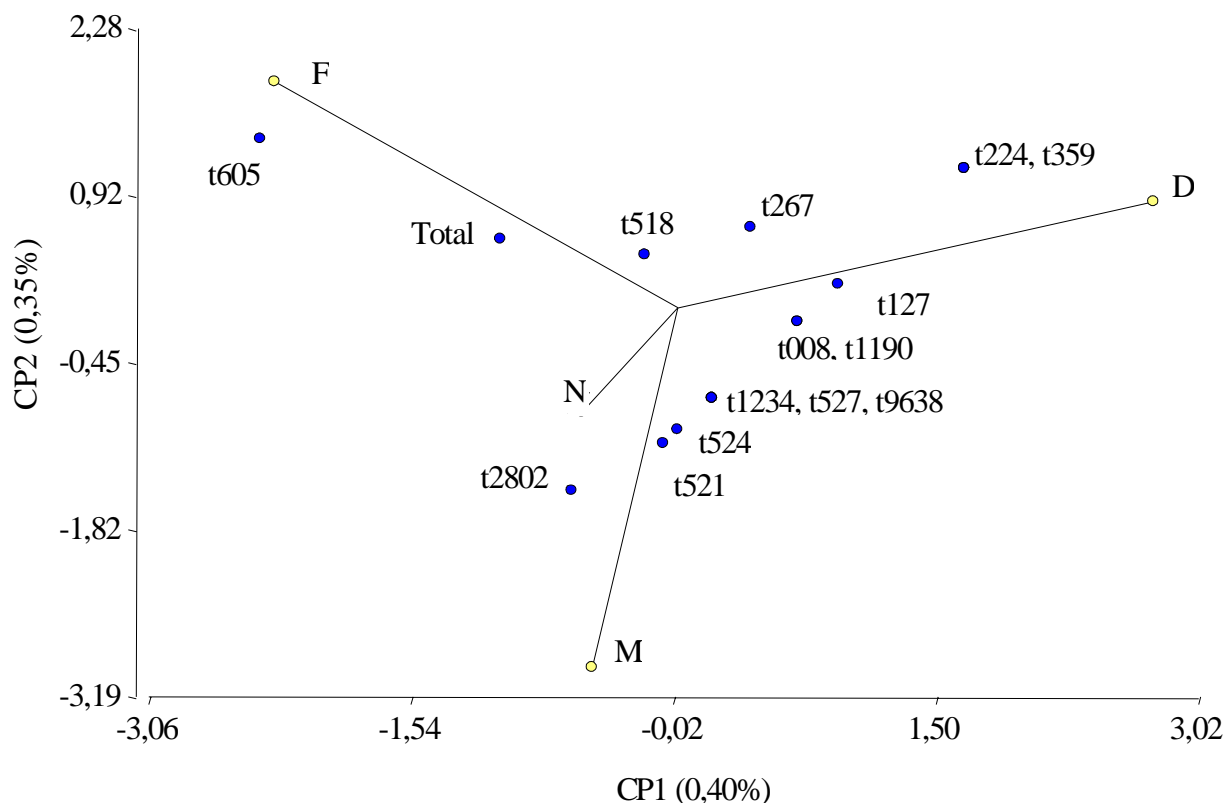
Teniendo en cuenta los valores medios de DO de cada genotipo, se observa un comportamiento similar entre todos ellos, excepto el t605, cuyo comportamiento está relacionado con la alta producción de biofilme (Figura 2).

## DISCUSIÓN

La detección temprana y control de *Staphylococcus* potencialmente patógenos es un paso esencial para la prevención y control de la mastitis bovina, por lo que existe la necesidad de contar con métodos simples para la detección de cepas productoras de biofilme, toda vez que el biofilme constituye un marcador de virulencia que puede ser detectado por ensayos fenotípicos (15, 16).

Por ello, el presente estudio sienta las bases metodológicas y de conocimiento de la expresión de biofilme en patógenos de la mastitis en Cuba.

La baja sensibilidad mostrada por el método de ARC, hace que esta técnica no sea adecuada para determinar la producción de biofilme en cepas de *S. aureus*; el 44.8% de sensibilidad significa que puede producir un alto número de falsos negativos. Resultados similares han sido obtenidos en otras investigaciones (17, 18). Sin embargo, el ensayo ARC resultó ser muy específico, debido a que los polisacáridos extracelulares se combinan específicamente con el colorante Rojo Congo, lo cual ha sido demostrado en exopolisacáridos de *Staphylococcus* (19). Como se



**FIGURA 2.** Relación de genotipos *Spa* con respecto al tipo de producción de biofilme. Análisis de Componentes Principales. Categorías de producción de biofilme, F: fuerte, M: moderada, D: débil y N: no productor de biofilme. / *Relation among each Spa genotypes and kind of biofilm production. Main Component Analysis. Types of biofilm production: F: strong, M: moderate, D: weak and N: non biofilm producer.*

ha confirmado en otras investigaciones (18,20), la baja sensibilidad relativa del método ARC puede ser explicada porque biológicamente el *slime* que detecta no es siempre necesario para formar finalmente el biofilme.

Varios autores han utilizado la amplificación de genes específicos que codifican para la formación de biofilme, e incluso se ha utilizado como método de referencia para comparar con los métodos fenotípicos (17, 21). Sin embargo, el uso de un número reducido de estos genes para evaluar a las cepas como productoras de biofilme, debe utilizarse con cuidado, pues la presencia de los genes más comúnmente probados: *ica A* y *D*, muchas veces no se correlaciona con cepas alta productoras de biofilme (21). Lo anterior puede justificarse por la existencia de otros genes no identificados aún, necesarios para la síntesis de exopolisacáridos y acumulación de biofilme (22). En todo caso, el análisis mediante PCR sólo revela la predisposición genética para la formación de biofilme y la expresión de genes relacionados con ello; en consecuencia, la forma-

ción real de biofilme debe ser confirmada por métodos fenotípicos adicionales. De tal manera, el método de detección de biofilme en placa de poliestireno ha sido considerado como el estándar de oro (18), además se recomienda para el análisis de rutina de producción de biofilme en cepas de *S. aureus* aisladas de leche (17). Una de las ventajas más importantes de este método es la posibilidad de cuantificar la producción de biofilme o formación de biomasa, permitiendo un análisis más detallado del nivel de expresión del proceso.

El elevado porcentaje de cepas cubanas de *S. aureus* que producen biofilme, confirma la importancia clínica de estas, asociadas a la mastitis bovina en nuestro país, ya que la habilidad de formar biofilmes se reconoce como un factor de virulencia en estafilococos (20) y se considera que las cepas que los producen tienen una habilidad incrementada de colonizar el tejido hospedero (10). Otros estudios similares describen valores parecidos o menores al obtenido en este trabajo, los que pueden variar entre 39.9 al 98.9% (17, 23).

El por ciento de aislados cubanos que produce fuerte formación de biofilme también es superior a lo descrito por otros autores: 12.85% (2) y 18.5% (20) en *S. aureus* de mastitis bovina, lo que evidencia la importancia de seguir investigando este factor de patogenicidad y su papel en las condiciones cubanas.

El tipo de producción promedio de biofilme varía entre cepas de *S. aureus*. Obviamente aquellas cepas que producen más (o más rápido) el biofilme tendrán las mayores ventajas referentes a la colonización del tejido hospedero, protección contra el sistema inmune, antibióticos y contra factores ambientales, aumentando la persistencia en ambos entornos. Lo anterior se aplica al hecho de que hay un genotipo, el t605, que supera al resto en la habilidad de producción de biofilme. Si la alta producción de biofilme está ligada al genotipo circulante, entonces el por ciento de producción determinado en las investigaciones va a depender de la proporción de genotipos incluidos en el estudio. Aquí el número de aislados disponibles de t605 fue alto con respecto a los demás, por tanto, eleva el promedio de alta producción de biofilme en las cepas estudiadas de *S. aureus* de origen bovino en el país.

La capacidad de formar biofilme por cepas de *S. aureus* de mastitis bovina, no sólo tiene importancia desde el punto de vista de la patogenicidad hacia el animal, si no que esta habilidad se extrapola a las industrias de manufactura de leche, donde el microorganismo puede adherirse y persistir ante condiciones adversas, mediante biofilmes a las estructuras abióticas de procesamiento de alimentos. Aunque se conoce que el acero inoxidable (ampliamente utilizado en la industria alimenticia) no permite la adherencia de bacterias, sí se ha visto que si presenta microgrietas sirve de forma ideal para la acumulación y formación de biofilmes microbianos (24). Además, en las condiciones de procesamiento de alimentos, la concentración de glucosa y cloruro de sodio generalmente son las adecuadas para promover la formación de biofilme de *S. aureus* (25).

Debido a que el biofilme constituye una estructura de resistencia ambiental para la bacteria (deseccación, falta de nutrientes, falta de hospedero) (26), las cepas altas productoras de biofilme tendrán más opciones de sobrevivir en el entorno de la vaca, por ejemplo: en el equipo de ordeño (teteras, tuberías, tanques de almacenamiento), tanques de agua, cama del animal, piel, instrumentos, etc. Teniendo en cuenta que se ha demostrado la estructura no suelen ser removidas, luego de sucesivos lavados en biomateriales (27), se debe considerar y estudiar si la rutina de limpieza es suficiente para eliminar el biofilme en el equipo de ordeño.

Estudios similares al nuestro se han realizado, unos con el objetivo de solamente evaluar técnicas de producción de biofilme (17), otros para caracterizar la producción fenotípica de un conjunto de aislados patógenos de mastitis (28) y unos pocos relacionan la producción de biofilme con genotipos de esos patógenos (21, 29). En el último caso la correlación se ha llevado a cabo con los genotipos generados por la secuenciación de multilocus (MLST) (29) o por la electroforesis de campo pulsante (PFGE) (21); hasta donde se conoce, no se ha establecido la relación directa de la producción de biofilme con la tipificación Spa en *S. aureus*; por lo que el presente estudio constituye el primer reporte sobre un genotipo Spa asociado a la alta producción de biofilme, teniendo en cuenta el creciente uso de la genotipificación Spa y el interés por dilucidar el perfil de virulencia de los patógenos de la mastitis.

Desde el punto de vista económico el uso rutinario de tipificación de cepas no es factible actualmente en la práctica veterinaria ni en el control general del rebaño lechero (30), lo que puede cambiar si se comprueba la asociación entre cepas y características de importancia como: índice de curación, severidad de la enfermedad o velocidad de diseminación y resistencia a antimicrobianos. Entonces, tal conocimiento hace que determinadas cepas sean de relevante importancia que justifique el uso de sistemas diagnósticos de detección de dicha variante genética, en nuestro caso el genotipo t605, por lo que se puede contribuir a la toma de decisiones racionales y prever los daños que puede ocasionar una cepa altamente virulenta y de rápida diseminación. Por el contrario, para las cepas o genotipos menos virulentos y lenta diseminación, el control es menos urgente y los recursos de la granja deben racionalizarse.

Debido al incremento de *Staphylococcus* sp. multirresistentes a antibióticos y el lento desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, la presencia de *S. aureus* sigue siendo un problema serio para el control de la mastitis (31). La vacunación es un acercamiento lógico al control de enfermedades infecciosas en animales de producción de alimentos. A pesar de que hace varias décadas se vienen desarrollando vacunas para prevenir la infecciones estafilocócicas, en su mayoría no han sido exitosas (32). En los últimos años se vienen estudiando candidatos vacunales basados también en compuestos derivados del biofilme de *S. aureus* (33). Una bacterina conformada con cepas alta productoras de biofilme podría ser una alternativa económicamente factible para el control de las mastitis bovina por *S. aureus*.

Se recomienda realizar futuras investigaciones para modificar la metodología de ARC, con el objetivo de mejorar su sensibilidad para detectar biofilme, toda vez que sería un método más sencillo y rápido que el de PVC. También se sugiere incluir en el estudio otros genotipos de *S. aureus* y otros patógenos de la mastitis bovina. Resultaría interesante además, determinar la relación de la formación de biofilme en el tiempo.

## CONCLUSIONES

El método de elección para determinar la producción de biofilme es el de placa de poliestireno con tinción con Violeta Cristal, con el que se determinó que las cepas cubanas de *S. aureus* son altas productoras de biofilme. Así mismo se determinó, que la capacidad de formar biofilme fuerte es característico en al menos un genotipo *Spa*, por lo que t605 tiene potencialidades patogénicas importantes dentro de la mastitis bovina, que le pueden conferir gran capacidad de resistencia y persistencia en la infección a la glándula mamaria.

## REFERENCIAS

- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 2006;171(3):398-407.
- Milanov D, Lazia S, Vidia B, Petrovia J, Bugarski D, Šeguljev Z. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta veterinaria.* 2010;60(2-3):217-226.
- Ruiz AK, González D, Peña J. Situation of bovine mastitis in Cuba. *REDVET.* 2012;13(12).
- Armenteros M, Peña J, Pulido JL, Linares E. Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en Cuba. *Rev Salud Anim.* 2002;24(2):99-105.
- Novoa R, Armenteros M, Abeledo MA, Casanovas E, Valera R, Pulido J. Impacto epizootológico y económico de la mastitis bovina en rebaños lecheros de la provincia de Cienfuegos *Rev Salud Anim.* 2004;26(3):178.
- Costerton J, Stewart PS, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-1322.
- Barrio B, Vangroenweghe F, Dosogne H, Burvenich C. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Veterinary Research.* 2000;31:603-609.
- Babra C, Tiwari JG, Pier G, Thein TH, Sunagar R, Sundareshan S, et al. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol (Praha).* 2013 Feb 28.
- Cucarella C, Tormo MÁ, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity.* 2004;72(4):2177-2185.
- Arslan S, Özkardes F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2007;102(1):29-33.
- Hogan JS. *Laboratory handbook on bovine mastitis:* National Mastitis Council; 1999.
- Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A, Alatosava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology.* 1997;143(Pt 11):3491-3500.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(12):5442-5448.
- Mariana N, Salman S, Neela V, Zamberi S. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research.* 2009;3(6):330-338.
- Baselga R, Albizu I, Amorena B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol.* 1994;39(3-4):195-204.
- Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun.* 2010;34(1):81-89.

17. Melo PdC, Ferreira LM, Nader Filho A, Zafalon LF, Vicente HIG, Souza Vd. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44(1).
18. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of microbiological methods*. 2009;76(1):88-92.
19. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(8):872-874.
20. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*. 2006;118(1-2):133-140.
21. Marques VF, Souza M, Mendonça ECd, Alencar TAd, Pribul BR, Coelho SdMdO, et al. Phenotypic and genotypic analysis of virulence in *Staphylococcus* spp. and its clonal dispersion as a contribution to the study of bovine mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013;33(2):161-170.
22. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK-M, Horstkotte MA, et al. 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*. 2003;185(9):2879-2886.
23. Vautor E, Carsenti-Dellamonica H, Sabah M, Mancini G, Pépin M, Dellamonica P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (agr group, adherence, slime, resistance to antibiotics). *Small Ruminant Research*. 2007;72(2):197-199.
24. Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PL. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2nd Edition Online: Academic Press; 2011.
25. Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretø T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International journal of food microbiology*. 2007;116(3):372-383.
26. Stewart EJ, Satorius AE, Younger JG, Solomon MJ. Role of Environmental and Antibiotic Stress on *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Microstructure. *Langmuir*. 2013;29(23):7017-7024.
27. Dego OK, Van Dijk J, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary Quarterly*. 2002;24(4):181-198.
28. Moore GE. Biofilm Production by *Streptococcus uberis* Associated with Intramammary Infections. 2009.
29. Croes S, Deurenberg R, Boumans M-L, Beisser P, Neef C, Stobberingh E. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC microbiology*. 2009;9(1):229.
30. Zadoks R. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds [Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine]. Utrecht 2002.
31. Erskine RJ. Vaccination strategies for mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2012;28(2):257-270.
32. Hu C, Gong R, Guo A, Chen H. Protective effect of ligandbinding domain of fibronectin-binding protein on mastitis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. *Vaccine*. 2010;28:4038-4344.
33. Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;134(3-4):208-217.

Recibido: 4-7-2013.  
Aceptado: 2-9-2013.