

Evaluación de la producción de slime y formación de biofilm de *Staphylococcus aureus* aislados en vacas lecheras en el valle de Toluca.

Gerardo Mancera Cuadros^{1,2,3}, José Luis Zamora Espinoza², Jorge Pablo Acosta Dibarrat², Benjamín Valladares Carranza², Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo³, Jorge Luis Carlos Bedolla Cedeño⁴, Donald Arguedas Cortés⁵, Valente Velázquez Ordoñez^{2*}.

RESUMEN

La producción de leche en la región central de México se realiza principalmente en unidades de producción tipo familiar, sin embargo, en este tipo de sistemas, el ordeño se realiza bajo prácticas deficientes de higiene, resultando en la infección de la glándula mamaria (GM) y la contaminación de los productos derivados de esta industria con microorganismos como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). El *S. aureus* es considerado el principal agente causal de mastitis a nivel mundial, debido a que expresa diferentes factores de virulencia que favorecen la persistencia de la infección glandular. La formación de biofilm por *S. aureus* es una de las principales causas de persistencia de la infección en la GM y contaminación de subproductos derivados de la industria lechera. Para determinar la persistencia de la infección y la formación de biofilm por cepas de *S. aureus*; se realizó la evaluación de mastitis en un hato lechero del valle de Toluca durante el segundo semestre del año 2016, también

¹ Programa de Maestría y Doctorado PCARN –UAEM-CONACYT, ²Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México, ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, ⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ⁵Laboratorio de Agrobiotecnología Molecular del Área de Investigación y Transferencia de la Universidad Técnica Nacional, Sede Guanacaste,*Autor de correspondencia: vvo@uaemex.com

se realizó el aislamiento y caracterización fenotípica de cepas de *S. aureus* obtenidas de esta unidad de producción. La formación de biofilm se evaluó mediante crecimiento de colonias en Agar Rojo Congo (ARC) y crecimiento de colonias adherentes por el método Christensen. Se analizaron 80 aislamientos de *S. aureus*, mediante la prueba de crecimiento en ARC, se obtuvo el 43% de aislamientos positivos, 22% negativos, 25% se identificaron como productores intermedios y 10% como indeterminables. Por el método Christensen se describieron 34 cepas (42.5%) como altos productores de biofilm, un aislamiento como muy alto productor de biofilm, 32 aislamientos (40%) fueron moderadamente productores y 14 (17.5%) de los aislamientos fueron negativos. Así mismo se encontró relación entre el aislamiento de cepas de *S. aureus* productoras de biofilm y la persistencia de infección en las vacas del estudio.

Palabras clave: Hato familiar, mastitis, persistencia, biofilm, *S. aureus*.

INTRODUCCIÓN

En el Valle de Toluca el sistema de producción lechera de tipo familiar se distribuye ampliamente, favoreciendo el empleo y el desarrollo socioeconómico rural. Sin embargo, el sistema enfrenta problemas de manejo productivo y sanitario, con prácticas deficientes de higiene en el ordeño y alta prevalencia de infección de la glándula mamaria por cepas de *Staphylococcus* (*S. aureus*), biotipos humano y bovino, contribuyendo al desarrollo de mastitis afectando la economía de la producción, la salud de la glándula mamaria y representando un riesgo potencial a la salud pública por la posible contaminación de la leche y sus productos de origen animal (Manjarrez *et al.*, 2012).

El *S. aureus* es un patógeno contagioso de importancia a nivel mundial considerado el agente causal más importante de mastitis en el ganado bovino, al producir infecciones clínicas y subclínicas que afectan la salud y el bienestar animal y la calidad e inocuidad de la leche (Velázquez *et al.*, 2005).

El *S. aureus* produce diversos factores de virulencia que contribuyen en la patogénesis de las infecciones en el ganado lechero (Camussone y Calvino, 2013). Dentro de estos factores de virulencia las adhesinas asociadas a la superficie celular, que promueven la adhesión de la bacteria al epitelio glandular y su sobrevivencia en el medio ambiente adverso (Melchior *et al.*, 2006). La infección glandular persistente se desarrolla por el crecimiento bacteriano de cepas productoras de biofilm, al formar colonias adherentes rodeadas por una matriz de exopolisacáridos cuya estructura completa caracteriza al biofilm, a diferencia de la capa extracelular de la pared bacteriana denominada slime (Costerton *et al.*, 1999).

La consideración del slime como un factor de virulencia diferente, constituye un biomarcador de virulencia para diferenciar las cepas de tipo capsular del *S. aureus* (Baselga *et al.*, 1994). La presencia del slime contribuye clínicamente a la bacteriemia relacionada con la contaminación de catéter intravenoso y de materiales utilizados en cirugía con SCN (Christensen *et al.*, 1985). La producción de slime se ha detectado también en cepas *S. aureus* aisladas de casos de mastitis humana y bovina. Se ha considerado que las cepas productoras de slime tienen una mayor capacidad de colonización

del tejido del hospedero y mejor protección contra la opsonización y la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos (Aguilar *et al.*, 2001, Arslan y Özkardes, 2007).

La adhesión del *S. aureus* al epitelio de la GM es crítico en la patogénesis de la mastitis, una vez adherido el agente al epitelio alveolar produce inflamación severa y lesiones graves al tejido glandular producto de la inflamación crónica provocando el incremento del CCS (Cucarella *et al.*, 2004; Von Eiff *et al.*, 1999).

En las últimas décadas se han tratado de explicar los mecanismos que contribuyen con la persistencia de *S. aureus* dentro de la GM, demostrándose que tiene la habilidad de producir biofilm, lo que le ayuda a colonizar y adherirse al epitelio glandular, contribuyendo con la persistencia de la infección y promoviendo el curso crónico de la enfermedad. Así mismo la formación de biofilm está asociado a la reducción de la sensibilidad del *S. aureus* a los tratamientos con antibióticos y a la evasión de la respuesta inmune contra éste por las células y mecanismos de defensa del sistema inmunológico de las vacas (Aguilar *et al.*, 2001; Vasudevan *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2005).

Se han descrito distintos protocolos para la evaluación cualitativa de slime y biofilm; para la detección de la formación de slime diferentes autores han utilizado el método desarrollado por Freeman *et al.*, (1989), que consiste en el cultivo de cepas bacterianas en medio de cultivo denominado Agar Rojo Congo (ARC). Mientras que la producción de biofilm se ha detectado por un método específico en el que permite ver la adherencia de las colonias bacterianas y que, al ser teñida con cristal violeta, observándose el crecimiento bacteriano adherido a la pared de tubos en los que fueron incubadas las cepas durante 48 horas; de manera que se puede asociar la mayor intensidad y extensión de la tinción con una mayor o menor capacidad de adherencia de la cepa a superficies inertes (Christensen *et al.*, 1982).

En el presente estudio se evaluó la capacidad para producir slime y formar biofilm de 80 cepas *S. aureus* aislados de muestras de vacas del valle de Toluca con mastitis subclínica. La producción de slime fue determinada mediante la observación de la morfología de las unidades formadoras de colonia (UFC) en Agar Rojo Congo

(ARC). Mientras que la habilidad para formar biofilm se realizó mediante la prueba de tinción de poblaciones bacterianas adheridas a superficies inertes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Como criterios de inclusión para la obtención de muestras en el presente trabajo se seleccionó a las vacas con tiempo de lactancia ≥ 2 meses y < 7 meses, vacas desde primer parto hasta 5 partos, cuartos con reacción positiva a la prueba de mastitis (CTM) 1-3, cuartos mamarios con mastitis clínica y presencia de coágulos en leche no fueron muestreadas.

Aislamientos bacterianos

Se tomaron 380 muestras individuales de leche de los diferentes cuartos mamarios de vacas con mastitis subclínicas, originarias de granja de producción familiar, de las que se obtuvieron 80 aislamientos de *S. aureus*. El hato lechero se ubica en el Valle de Toluca. Los aislamientos fueron identificados con base en sus características morfológicas, catalasa positiva, tinción de Gram, hemólisis en Agar Sangre (AS), oxidación de manitol, producción de coagulasa y producción de DNAsa. Una vez identificados los aislamientos fueron nuevamente cultivados en AS para su crecimiento y análisis de cepas productoras de slime y formadoras de biofilm.

Detección de producción de slime

Preparación del medio de Cultivo Agar Rojo Congo (ARC)

En diferentes trabajos se han utilizados una amplia gama de medios de cultivo para el análisis de la producción de slime, sin embargo, en el presente trabajo se utilizó como medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) al que se le adicionó 50 g/L de sucrosa y 0.8 g/L de Rojo Congo. Mismo que fue esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Detección de la producción de slime

La producción de slime de todos los aislamientos obtenidos fueron evaluados por el método cualitativo de crecimiento en Agar Rojo

Congo (ARC), mediante el protocolo descrito por Freeman *et al.*, (1989). Las placas con medio de cultivo ARC, fueron inoculadas e incubadas en aerobiosis por 24 horas a 37 °C. y posteriormente fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta las 48 horas. Los cultivos positivos fueron indicados por colonias negras con consistencia cristalina seca.

Ensayo de la formación de biofilm

Preparación del medio de cultivo

En la presente investigación se utilizó BHI como medios de crecimiento bacteriológico y cristal violeta como colorante. Se preparó el medio de cultivo, se colocaron 5 ml de éste en tubos Falcon y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos.

Detección de la formación de Biofilm

En el presente estudio se evaluó la formación de biofilm utilizando el método desarrollado por Christensen *et al.*, 1982, que consiste en la detección de biofilm mediante la tinción de las poblaciones bacterianas adheridas a superficies inertes. En los tubos previamente preparados con medio de cultivo se inocularon con los aislamientos bacteriológicos de *S. aureus* y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo y se tiñó el interior de los tubos con cristal violeta, rotándolos manualmente para permitir la tinción del material adherido a las paredes, superficie y al fondo. Se eliminó el exceso de colorante y los tubos se secaron a 37°C, toda la noche. La detección de la formación de biofilm se evaluó estableciéndose una puntuación de 0 a 3 para la abundancia de cúmulos bacterianos en el tubo, en diferentes localizaciones (fondo, pared y superficie), dando una puntuación global de 0 a 9; se consideró como cepa productora de biofilm aquella en que la suma de la puntuación obtenida de las diferentes localizaciones fuera mayor de 5 puntos.

Evaluación de resultados

Los resultados se evaluaron mediante la prueba de χ^2 ($p < 0.05$), a partir de las frecuencias observadas y los valores esperados de la expresión del slime y biofilm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *S. aureus* es considerado el principal agente causal de mastitis en vacas lecheras, la elevada frecuencia de infección observada por *S. aureus* en el estudio, se puede explicar que la persistencia de la infección es atribuida a los factores de virulencia del patógeno (Oliveira *et al.*, 2006). En los aislamientos se observaron diferencias en la proporción de *S. aureus* productores de slime y biofilm. Es reconocido que existen diferentes cepas de *S. aureus* productoras de slime y biofilm, mismos que provocan una mayor colonización de la GM que sus variantes no productoras (Milanov *et al.*, 2010), En el presente estudio se estudió cualitativamente la producción de slime fenotípicamente a partir de la morfología de colonias en Agar Rojo Congo (ARC) (Freeman *et al.*, 1989). Se observó que en algunas cepas positivas el desarrollo de la expresión de slime fue débil a las 24 horas, mejorándose su crecimiento y diferenciación a las 48 horas coincidiendo con su interpretación (Milanov *et al.*, 2010), el método descrito por Freeman *et al.* (1989), permitió identificar los fenotipos de slime positivo, de acuerdo con Peña y Uffo, (2013), las cepas adherentes productoras de slime, desarrollan colonias oscuras de aspecto cristalino seco. Mientras que las colonias de Saureus no productoras aparecen usualmente de color rojo o rosa. Así mismo describen como cepas intermedias aquellas que tienen un aspecto oscuro solamente. En los resultados del estudio realizado con los aislamientos de *S. aureus* de vacas lecheras, en el medio de ARC se observaron tres tipos de colonias: una de color negro con una consistencia seca y cristalina que corresponden a los resultados positivos. Mientras que las colonias negativas generalmente tuvieron un crecimiento color rosa. En algunas placas el crecimiento de las colonias bacterianas se observó de aspecto oscuro, pero con la ausencia de una morfología colonial seca y cristalina a las que se les clasificó con un resultado intermedio (Figura.1 a, b, c) respectivamente).

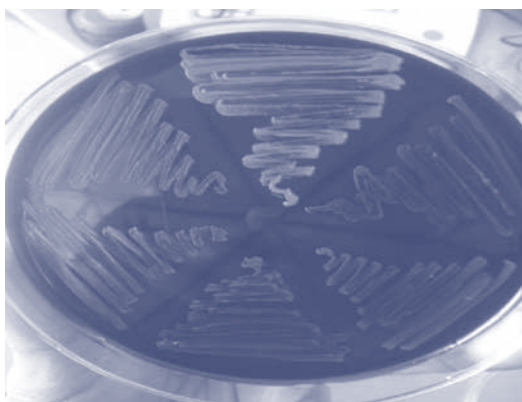


Figura 1: Medio de cultivo ARC, morfología de las diferentes colonias bacteriana, a) Positiva: color negro con una consistencia cristalina seca, b) Negativa: color rosa. c) Intermedio: oscuras, pero con la ausencia de color cristalino seca.

En el estudio del total de aislamientos evaluados mediante la prueba cualitativa de crecimiento bacteriológico en ARC, los positivos observaron la mayor frecuencia en comparación con los fenotipos negativos y productores intermedios. Una proporción menor de aislamientos se consideraron como indeterminables. En otros estudios se han observado una menor expresión de slime comparado con el presente estudio; en lo que se encontró el 11,42% de aislamientos positivos, mismos que produjeron colonias oscuras características con consistencia cristalina seca. Mientras que Citak *et al.*, 2003 establecieron la producción de slime en 5.1% de *S. aureus* aislados de muestras de leche cruda. Oliveira *et al.*, (2006); Krukowski *et al.*, (2008) y Peña y Uffo, (2013) encontraron altos porcentajes de cepas de *S. aureus* productoras de slime en estudios realizados en vacas con casos persistentes de mastitis diferentes países, estos resultados son semejantes a los encontrados en el presente estudio, con un 37,5%, 42,37% y 43.8% respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos por Vasudevan *et al.* (2003) reportaron frecuencias mayores en 35 aislamientos de *S. aureus* obtenidos de animales con mastitis de los cuales 32 de estos produjeron colonias negras típicas dentro de 24-48h, lo que representa el 91.4% de aislamiento productores de slime, contrastados con los resultados del presente estudio.

En este sentido, en el presente trabajo se consideraron como positivas aquellas colonias que presentaran el fenotipo de las colonias con aspecto oscuro brillante seco como el reportado por Citak *et al.*, (2003), mientras que las colonias con aspecto oscuro se interpretaron como productoras, sin embargo, Oliveira *et al.*, (2006), Arslan y Özkardes, (2007); Jain y Agarwal, (2009), consideraron esta característica como un resultado positivo en sus investigaciones. Además, las colonias rojas o rosas observadas en esta investigación fueron consideradas como aislamientos negativos, mientras que Milanov *et al.*, (2010), las describió como un resultado indeterminado. Sin embargo, Cucarella *et al.*, (2004), describen la superficie cristalina seca como resultado positivo, sin tomar en cuenta el color de la colonia (negro o rosa). Esta discrepancia en cuanto a la interpretación de los resultados puede ser explicada porque han sido diferentes los medios de cultivo utilizados por los autores de dichos trabajos, así como al hecho de que la prueba no

fue originalmente diseñada para investigar la producción de slime en aislamientos de *S. aureus*, sino para identificar cepas de SCN productoras de slime.

En el presente estudio la habilidad de los aislamientos de *S. aureus* para formar biofilm fue evaluada en tubos de polietileno. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 1. Al considera su adherencia al tubo en las diferentes localizaciones (superficie, pared y fondo) y la cantidad de aislamiento por puntuación (0-9). Del total de aislamientos evaluados el 42.5% mostraron puntuaciones elevadas de formación de biofilm (más de 5). Solo un aislamiento se consideró como muy alto productor de biofilm (puntuación máxima de 9) Figura 2. En cuanto a los aislamientos moderadamente formadores de biofilm (4-5) fueron menos frecuentes. Los aislamientos considerados como negativos a la formación de biofilm con puntuaciones globales de 0-3 puntos fueron 14 representando el 17.5% del total de aislamientos analizados en este estudio.

Tabla 1: Total de puntos obtenidos por aislamiento, cantidad de aislamientos por puntuación 0-9 y porcentaje total.

Puntuaciones Globales	Cantidad de aislamientos por puntuación	% total de aislamientos por puntuación	Categoría de formación de biofilm
Aislamientos con puntuación 0-3	14	17.5%	No formadores
Aislamientos con puntuación 4-5	32	40%	Moderado formador
Aislamientos con puntuación 6-8	33	41.25%	Alto formador
Aislamientos con puntuación 9	1	1.25%	Muy alto formador
Total	80	100%	Toda la categoría

Tabla 2: Resultados del ensayo de formación de biofilm de los aislamientos de *S. aureus*.

Número total de cepas del estudio y porcentaje total	Cantidad, porcentaje y categoría de formación de biofilm de las cepas analizadas			
	No formadores de biofilm (0-3 puntos)	moderada formación de biofilm (4-5 puntos)	Alta formación de biofilm (6-8 puntos)	Muy alta formación de biofilm (9 puntos)
80	14	32	33	1
100%	17.5%	40%	41.25%	1.25%

Bardiau *et al.*, (2016) realizó un estudio en el que analizó 168 cepas de *S. aureus* de 4 diferentes países de los que reportó que el 11% de éstos eran aislamientos no formadores de biofilm, mientras que para los aislamientos moderadamente, altamente y muy altamente productores de biofilm le correspondieron el 51, 29 y 10% respectivamente, estos resultados difieren de los obtenidos en la presente investigación ya que los resultados obtenidos fueron para los aislamientos altamente formadores, mientras que para los muy altos formadores y moderadamente formadores fueron menores.

En el presente trabajo se encontró solo el 1.25% de aislamientos muy altamente productores de biofilm ($p < 0,01$). Sin embargo en diferentes investigaciones se ha reportado una mayor frecuencia de aislamientos de este tipo, Oliveira *et al.*, (2006), por su parte reportó una frecuencia del 18.75% de aislamientos muy altamente formadores de biofilm al realizar sus ensayos en microplacas de 96 pozos, mientras que Milanov *et al.*, (2010), obtuvo en su investigación el 12.85% de sus aislamientos como muy altamente productores de biofilm.

Así mismo en los datos obtenidos por Peña y Uffo, (2013), reportaron que el 98% (96/98) de los aislamientos de *S. aureus* resultaron ser productores de biofilm difiriendo de los resultados de la presente investigación en donde solo el 82.5% de los aislamientos obtenidos fueron formadores de biofilm. Tomando en cuenta las intensidades en la formación de biofilm de los diferentes aislamientos, estos autores reportaron 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. Los datos reportados por estos autores difieren en gran manera de los obtenidos en el presente trabajo, ya que solo el 1.25% de los aislamientos fueron encontrados como altamente productores y mientras que el 17.25% de estos se consideraron como no productores.

El análisis de la relación entre la formación de biofilm por las cepas de *S. aureus* obtenidas de hatos lecheros familiares y la persistencia de la infección en la GM por *S. aureus* en esta explotación, se realizó utilizando tablas de frecuencia en las que se incluyeron los datos de la formación de biofilm por los métodos fenotípicos antes mencionados y los datos obtenidos para la persistencia a la inflamación e infección de la glándula mamaria por *S. aureus* Tabla 3.



Figura 2: Tubo Falcon, indica la fuerte presencia de formación de biofilm en 1) superficie, 2) pared y 3) fondo.

Tabla 3: Frecuencia de infecciones persistentes por *Staphylococcus aureus* y la formación de biofilm en el presente estudio.

Número de aislamientos	Frecuencia de muestras positivas a cultivo en RC	Frecuencia de muestras negativas a cultivo en RC	Frecuencia de muestras positivas a tinción con azul violeta	Frecuencia de muestras negativas a tinción con azul violeta	Frecuencia de Vacas persistentes a la infección por <i>S. aureus</i>	Frecuencia de Vacas no persistentes a la infección por <i>S. aureus</i>
80	68%	22%	82.8%	17.2%	69.6%	30.4%

($p < 0.05$)

CONCLUSIONES

Se encontraron colonias productoras asociadas a la evaluación de la producción de slime y biofilm en aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas lecheras. Estos resultados permiten establecer que existen cepas de *S. aureus* adaptadas de manera diferente al hospedero y al medio ambiente en el que se desarrollan.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la existencia de cepas productoras de slime y formadoras de biofilm que al igual que en numerosos estudios demuestran la habilidad de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas con mastitis para producir slime y formar biofilm. Esta propiedad contribuye de manera significativa con la sobrevivencia de la bacteria en condiciones medioambientales hostiles y es considerado como uno de los mecanismos de patogenicidad responsables de la persistencia de IIM y presentación de infecciones crónicas en el ganado lechero.

Los resultados demuestran que el método de elección para determinar la producción de biofilm es el de siembra en tubo de poliestireno con tinción de Cristal Violeta. Con esta prueba se determinó que la mayoría de las cepas de *S. aureus* son altamente productoras de biofilm. Así mismo se determinó que al menos uno de los aislamientos que fueron analizados tiene muy alta capacidad de formar biofilm, lo que le puede conferir un alto potencial patogénico como agente causal de la mastitis en el ganado bovino y le puede otorgar la capacidad de resistencia a los antibióticos y la persistencia en la infección a la glándula mamaria.

Agradecimientos o fuente de financiamiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para cursar estudios de grado de Doctorado (PCARN-UAEM). A la Secretaria de Investigación de la UAEM por el financiamiento otorgado a través del proyecto de investigación “Variación genética de aislamientos de *S. aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar”, clave 3848/2013CHT. A la Secretaria de Investigación de la UAEM por el financiamiento otorgado a través del proyecto de investigación “Distribución de serotipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros de producción familiar en tres regiones de México” 3783/2014/CIC.

REFERENCIAS

- Aguilar, B., Amorena, B., Iturralde, M. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 78: 183–191.
- Arslan, S., Özkardes, F. 2007. Slime production and antibiotics susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro.* 102(1): 29–33.
- Bardiaua, M., Caplin, J., Detilleux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., Mainil, J. G. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet Microbiol* 185: 1–6.
- Baselga, R., Albizu, I., Amorena B. 1994. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol* 39:195–204.
- Camussone, C.M., Calvinho, L.F. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev. Arg. Microbiol.* 45(2):119–130.
- Christensen, G. D., Bisno, A. L., Parisi, J. T., McLaughlin, B., Hester, M. G., Luther, R. W. 1982. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Intern. Med.* 96:1–10.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., Beachey, E. H. 1985. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J Clinical Microbiol.* 22: 996–1006.
- Citak, S., Varlik, Ö., Gündogan, N., 2003. Slime production and DNase activity of staphylococci isolated from raw milk. *J Food Saf.* 23: 281–288.
- Costerton, J.W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Cucarella. C., Tormo, M.Á., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. 2004, Role

- of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 72: 2177-2185.
- Fox, L. K., Zadoks, R. N., Gaskins, C. T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107: 295-299.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42: 872-874.
- Jain, A., Agarwal, A., 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods.* 76: 88-92.
- Krukowski, H., Szymankiewicz, M., Lisowski, A. 2008. Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Polish J Microbiol* 57(3): 253-255.
- Manjarrez, A. M. L., Días, S. Z., Salazar, F. G., Valladares, B. C., Gutiérrez, A. C. C., Barbabosa, A. P., Talavera, M. R., Alonso, M. U. F., Velázquez, V. O. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en el centro-este del Estado de México. *Rev Méx Cienc Pecu.* 3: 265-274.
- Melchior, M.B., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. *Vet J.* 171(3): 398-407.
- Milanov, D., Lazija, S., Vidija, B., Petrovija, J., Bugarski, D., Šeguljev, Z. 2010. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Vet.* 60 (2): 217-226.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela C. L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118: 133-140.
- Peña, J., Uffo, O. 2013. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 35: 189-196
- Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 92: 179-85.

- Velázquez, O.V., Pescador, S.N., Saltijeral, O.J. 2005. Epidemiología y control de la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras. In: Rodríguez V. R.I., editor: Enfermedades de importancia en la producción animal, México, D.F.: Editorial Mc Graw Hill; 355377.
- Von Eiff, C., Heilmann, C., Herrmann, M., Peters, G. 1999. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. *Infection*. 27: S7–S10.