

AKASMERIA



ppi 201502ZU4670

Esta publicación científica en formato digital es continuidad de la revista impresa ISSN 00755222

Volumen 45. N° 1. Enero - Junio 2017

Universidad del Zulia
Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Departamento de Enfermedades
Infecciosas y Tropicales
Maracaibo, Venezuela

Kasmera 45(1): 24-32, Enero-Junio 2017

Capacidad de formación de biopelícula y limo en *Staphylococcus* que causan mastitis subclínica bovina en el estado Zulia-Venezuela

Biofilm formation and slime producing ability in *Staphylococci* causing subclinic bovine mastitis in the Zulia state-Venezuela

Kutchynskaya Valero-Leal¹, Jhoandry Rivera-Salazar², Wilfido Briñez³, América Paz⁴, Eyilde Piña⁴, Yeiny Ávila⁵, Gladis Colina López⁶

¹Bacteriología Clínica, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina.

²Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Facultad Experimental de Ciencias.

³Unidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias.

⁴Practica Profesional de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina.

⁵Bacteriología General, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina.

⁶Laboratorio de Bacteriología Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Autor de correspondencia: Kutchynskaya Valero-Leal,
e-mail: kutchynskaya@gmail.com

RESUMEN

Un total de 79 cepas de *S. aureus* y 47 cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) aislados de muestras de leche de vaca con mastitis subclínica fueron evaluadas para establecer su propiedad para formar biopelícula como uno de los factores de virulencia más importantes. Usando el método de Rojo Congo Agar, 80% de las cepas de *S. aureus* fueron productores de limo, mientras que en las cepas de SCN el porcentaje fue de 32%. Por el método de microplaca, 55%, 17% y 28% de los aislamientos de *S. aureus* fueron fuerte, moderadas y débiles productoras de biopelícula, mientras en los SCN el porcentaje fue 43%, 17% y 40%, respectivamente. Se realizó un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a todos los aislamientos con la finalidad de identificar el gen A de adhesión intracelular (*icaA*). En las cepas de *S. aureus* el gen *icaA* estuvo presente en el 65% de los aislamientos, y en los SCN en el 11%. La mayoría de las cepas de *S. aureus* caracterizados en el estudio fueron formadores de biopelícula, lo cual sugiere que está tiene un importante papel en la virulencia de *S. aureus* aislados de infecciones intramamarias en bovinos del estado Zulia.

Palabras clave: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativa, biopelícula, limo, gen *icaA*

Recibido: 20/10/2016 Aceptado: 06/03/2017

ABSTRACT

A total of 79 *S. aureus* strains and 47 coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) isolates from cow milk suffering subclinical mastitis were investigated for their ability to form biofilm as one of the most important virulence factors. Using Congo Red Agar method, 80% of *S. aureus* strains were slime producers, while in CNS was 32%. By microtiter plate method, 55%, 17%, and 28% of *S. aureus* isolates were strong, moderate, and weak biofilm producers, respectively, while in CNS the percentages were 43%, 17%, and 40%, respectively. All isolates were screened by Polymerase chain reaction (PCR) for amplification of intercellular adhesion gene A (*icaA*). In *S. aureus* isolates the *icaA* gene was present in 65 % while in CNS was 11%. The majority of *S. aureus* characterized in this study formed biofilm, which suggests that biofilm formation has an important role in the virulence of *S. aureus* isolated from bovine intramammary infections in Zulia state.

Keywords: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, biofilm, slime, *icaA* gene.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina ocasionada por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) sigue siendo un problema importante para los productores de leche a nivel mundial (1). En Venezuela, *S. aureus* es el principal agente causal de la mastitis bovina, ocasionando, principalmente, una mastitis de tipo subclínica (2 - 4).

Una característica relevante de la mastitis subclínica es que no hay signos clínicos de la enfermedad y la leche aparentemente, no se encuentra alterada (5) pasando desapercibida si no se emplean métodos para su diagnóstico a nivel de campo y en el laboratorio (6). Dentro de los efectos negativos que ocasiona la mastitis subclínica al productor se encuentran; la reducción en la producción de la leche, el número de animales afectados por unidad de producción es mayor en comparación con los casos de mastitis clínica, y además los casos subclínicos se convierten en reservorios de microorganismos que conducen a la transmisión de la infección a otros animales, persistiendo la enfermedad dentro del rebaño (5).

La patogénesis de *Staphylococcus* en la mastitis es atribuida a la combinación de factores extracelulares, capacidad de adherencia y formación de biopelícula. La biopelícula se considera responsable de las infecciones crónicas

y/o persistentes, debido a que facilita la adherencia y la colonización de *Staphylococcus* al epitelio de la glándula mamaria, también contribuye a la evasión de las defensas inmunológicas, además ayuda a la bacteria a sobrevivir en condiciones ambientales hostiles dentro del hospedador. Adicionalmente, protege a la bacteria de la acción de los agentes antimicrobianos (7).

Si bien, en algunos estudios la formación de limo es considerada como producción de biopelícula (7-10), otros investigadores se refieren a estos dos términos como propiedades diferentes que describen fenómenos distintos (11-13), y es de esta manera como la hemos considerado en este estudio.

La biopelícula es una comunidad bacteriana englobada en una matriz de exopolisacáridos producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte (14), su composición es compleja, no solo presenta exopolisacáridos, también forman parte de su estructura, proteínas bacterianas y ADN extracelular (11). Por el contrario, el limo es una sustancia polimérica extracelular conocido también como polisacárido intracelular adhesina (PIA), el cual es producido durante el proceso de maduración de la biopelícula, su papel fundamental es el mantenimiento de la adhesión entre las células y actúa como barrera protectora contra el sistema inmunitario del hospedador (11,15).

Diversos estudios han sido reportados en diferentes regiones del mundo relacionados con la producción de biopelícula por *S. aureus* y SCN que causan mastitis (1, 11, 12, 16-18). En Venezuela, sin embargo, la capacidad de producción de biopelícula y limo por *S. aureus* y SCN aislados de mastitis no ha sido investigada. El objetivo de este estudio fue determinar por métodos fenotípicos y genotípicos la capacidad de formación de biopelícula y limo producidos por cepas de *S. aureus* y SCN aislados de mastitis subclínica bovina en el estado Zulia.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas

Se estudiaron un total de 126 cepas de *Staphylococcus*, 79 *S. aureus* y 47 SCN. Estas cepas fueron aisladas en estudios previos por Valero y cols. (4, 19), el aislamiento se realizó en leche de cuartos mamarios de bovinos con mastitis subclínica pertenecientes a 12 fincas del estado Zulia. La recolección de las muestras se realizó durante los años 2006 al 2009. Las cepas se mantuvieron criopreservadas en caldo soya tripticasa (CST) (HiMedia Laboratories, India) con glicerol (20% v/v) a -20°C en el Laboratorio de Bacteriología Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

Producción de Limo

La capacidad de producción de limo fue estudiada utilizando el medio de rojo Congo agar (RCA) desarrollado por Freeman y cols. (20). Para sembrar el RCA, las cepas debieron crecer previamente en CST glucosado al 0,25% durante toda la noche a 37°C . Luego de la inoculación en el medio de RCA, las placas se incubaron en una estufa (Fanem® 002CB, Sao Paulo-Brasil) por 24 a 48 horas a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se consideraron como colonias típicas productoras de limo, aquellas que mostraron rugosidad y coloración negra.

Producción de biopelícula

La propiedad de las cepas para formar biopelícula fue evaluada siguiendo la metodología de Christensen y cols. (21). Cada cepa se inoculó por triplicado en los pozos de placas de microtitulación (Becton Dickinson Labware, EUA), como control negativo y de

esterilidad, se utilizó caldo soya tripticasa (CST) glucosado sin inocular y como control de adhesión positivo la cepa ATCC 25923®.

Para la cuantificación de adhesión, las placas se llevaron a un lector de ELISA (Biorad, modelo 680) para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 630 nm (DO_{630}). Los valores promedios de DO_{630} obtenidos de cada cepa se consideró como el índice de adhesión bacteriana a la superficie de cada pozo al producir biofilm, cuyos valores previamente se corrigieron al restarles el promedio de la DO_{630} obtenidas en los pozos controles no inoculados.

Para cuantificar el poder de adhesión y formación de biofilm sobre las microplacas se siguió lo propuesto por Manijeh y cols. (22): En los supuestos casos donde se cumplió que: $\bullet \text{DO}_{630} \leq \text{DO}_c$ la cepa se consideró como *no productora de biopelícula*. $\bullet \text{DO}_c < \text{DO}_{630} \leq 2(\text{DO}_c)$ se consideró *débil productora de biopelícula*. $\bullet 2(\text{DO}_c) < \text{DO}_{630} < 3(\text{DO}_c)$ se consideró la cepa como *moderada productora de biopelícula*. $\bullet 3(\text{DO}_c) < \text{DO}_{630}$ se consideró la cepa como *fuerte productora de biopelícula*. En base a los supuestos antes descritos las cepas se clasificaron como: Cepa no productora de biopelícula: cepas con valores de absorbancia $\leq 0,068$; -Cepa débil productora de biopelícula: cepas con valores entre 0,069 – 0,121; -Cepa moderadamente productora de biopelícula: cepas con valores entre 0,122 – 0,162; y Cepa fuerte productora de biopelícula: cepas con valores $\geq 0,163$.

Extracción de ADN y detección del gen *icaA*

La extracción del ADN bacteriano se realizó utilizando el método de ebullición la cual fue descrita previamente (19). Para la PCR se utilizó un par de cebadores específicos para amplificar el gen *icaA* (*icaA*-F3'-GGTAGGTAAGAAATTGCAAT-5' e *icaA*-R3'-AGCGTTGGGTATTCCCTCTGTCT-5') Kiem y cols. (23). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μL conteniendo: 2.5 mM MgCl_2 ; Cebadores sentido y antisentido: 0.2 μM ; Buffer Taq hasta 1X; mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP): 0,2 mM; 1 μL del ADN extraído y previamente diluido con agua libre de ADNsa y RNAsa en proporción 1:10 y Taq polimerasa 1,25 U. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystem, Modelo PCR

2720, USA) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización previa del ADN a 94°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de amplificación, cuyo programa incluía: Desnaturalización: a 94°C por 30 seg., alineamiento de cebadores: a 55°C por 1 min., extensión: a 72°C por 1.5 minutos, finalmente se hizo una extensión final a 72°C por 7 minutos. La separación y observación de los productos de PCR se realizaron según especificaciones de Ausubel y cols. (24), por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % p/v, en una cámara horizontal con buffer TBE sometida a 103 voltios (95 ± 2 miliamperios) durante 1 hora. Finalizada la corrida, los geles fueron observados en presencia de luz U.V sobre un transiluminador UVP Chromato – VUE modelo TM-36 de 115 voltios, 60Hz y capacidad de 1,2 amperios, y fotografiado con una cámara digital (Easy Share, Kodak). El tamaño de los productos de PCR del gen *icaA* (~1.2 kb.) se determinaron según sus migraciones en los geles de agarosa y comparadas con la migración de las bandas de ADN estándar del marcador de peso molecular λ /*Hind* III (Promega ®, EUA).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se utilizó estadística descriptiva para determinar los porcentajes de cepas productoras de limo, biopelícula y presencia de gen *icaA*. La prueba de chi-cuadrado fue aplicada para determinar diferencias entre el tipo de cepa y la producción de limo, biopelícula y presencia de gen *icaA*. Se hizo una comparación de media de las absorbancias de cada cepa mediante el T-students, con los datos obtenidos con un nivel de confianza del 99%. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa Statgraphics plus versión 5.1.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de producción de limo, biopelícula y presencia del gen *icaA*. Al ser evaluada sobre el RCA la capacidad de producción de limo, se encontró que el 62% de los aislamientos (78/126) mostraron los fenotipos característicos de cepas formadoras de limo, la cual se pudo evidenciar mediante la aparición de colonias negras rugosas sobre el medio de RCA

suplementado con glucosa, la no producción se observó en el 38% (48/126) mediante la formación de colonias de color rojo. Las cepas de *S. aureus* fueron más productoras de limo (80%; 63/79) al compararse con las cepas de SCN (32%; 15/47), estos resultados fueron significativamente diferentes ($P < 0,01$).

Mediante el método de adhesión a microplacas de poliestireno se observó la producción de biopelícula basado en la cantidad de cristal violeta que se unió a la biopelícula. En la Tabla 1 se puede apreciar que el 85% (107/126) del total de las cepas analizadas de *Staphylococcus* spp. fueron formadores de biopelícula. De las 79 cepas de *S. aureus* evaluadas, 72 (91%) resultaron productoras, mientras que de las 47 cepas de SCN 35 (74%) fueron las formadoras de biopelícula, estos resultados fueron significativamente diferentes ($P < 0,01$), la diferencia también se evidenció cuando se comparó el valor medio de la absorbancia a una densidad óptica de 630 nm. (DO_{630nm}), *S. aureus* presentó el valor medio más alto (0,277) en comparación con las cepas de SCN (0,144) ($P < 0,01$).

En las cepas de *S. aureus* formadoras de biopelícula, el 55% (40/72) fueron catalogadas como fuertes productoras, mientras que el 17 y 28% se clasificaron como moderadas y débiles, respectivamente. En el caso de los SCN el 43% (15/35) se ubicaron como fuerte formadoras, el 17% como moderadas y el 40% de las cepas formaron una estructura débil (Tabla 1).

En forma simultánea se observó la producción de biofilm y limo en el 81% (58/72) de los aislamientos de *S. aureus*, contrariamente a lo expresado por los SCN, en este grupo de especies el mayor porcentaje de cepas formadoras de biofilm se caracterizaron por no producir limo (60%, 21/35) (Tabla 2).

En cuanto al marcador molecular determinado el gen *icaA* (Figura 1), fue detectado en el 44% (56/126) del total de las cepas, siendo más observado en *S. aureus* (65%, 51/79), que en SCN donde el gen estuvo presente solo en 5 cepas (11%) ($P < 0,01$) (Tabla 1). En la Tabla 2 se puede apreciar que, en el 67% de las cepas de *S. aureus* que fueron productoras de biopelícula el gen *icaA* estaba presente, mientras que, en el caso de los SCN, el gen *icaA* se amplificó solo el 14% de las cepas productoras de biopelícula.

Tabla 1. Resultados de la producción de limo, biopelícula, tipo de biopelícula formado y amplificación del gen *icaA* en aislamientos de *S. aureus* y SCN de vacas con mastitis subclínica

Especies (N°)	Limo ^a		Biopelícula ^a		Abs ^c	Clasificación cepas Productoras de Biopelícula ^a			<i>icaA</i> ^a	
	Productor	No Productor	Productor	No Productor		Fuerte	Moderada	Débil	Presencia	Ausencia
<i>S. aureus</i> (79)	63 (80) ^a	16 (20)	72 (91) ^a	7 (9)	0,277 ^a	40/72 (55)	12/72 (17)	20/72 (28)	51 (65) ^a	28 (35)
SCN (47)	15 (32) ^b	32 (68)	35 (74) ^b	12 (25)	0,144 ^b	15/35 (43)	6/35 (17)	14/35 (40)	5 (11) ^b	42 (89)
Total (126)	78 (62)	48 (38)	107 (85)	19 (15)	0,227	55/107 (51)	18/107 (17)	34/107 (32)	56 (44)	70 (56)

^{a, b} superíndices diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$); ^cAbsorbancia; ^{*} Entre paréntesis valores correspondientes a los porcentajes que representan

Tabla 2. Producción de limo y presencia de *icaA* en las cepas de *S. aureus* y SCN productoras de biopelícula

Cepas productoras Biopelícula (N°)	Limo N°(%)		<i>icaA</i> N°(%)	
	Productoras	No Productoras	Presente	Ausente
<i>S. aureus</i> (72)	58 (81)	14 (19)	48 (67)	24 (33)
SCN (35)	14 (40)	21 (60)	5 (14)	30 (86)

DISCUSIÓN

Al utilizar el RCA como método de detección de limo en *S. aureus* y SCN aislados de mastitis subclínica, los resultados reportados difieren entre autores. Para *S. aureus* la producción de limo oscila entre 11 y 91% (7, 9, 25 - 28), en el caso de SCN varía de 14,1 a 29,5%, (1, 12). Las discrepancias reportadas pueden estar relacionadas con el hecho de que el RCA es un método que se basa en una evaluación subjetiva cromática, donde la variación del color rojo a negro en las colonias es progresivo, pudiendo resultar algunas veces difícil para el investigador clasificar correctamente la cepa de acuerdo a la morfología colonial (29).

Las cepas de *S. aureus* resultaron ser mayores productoras de limo (80%) que las de SCN (32%), este hallazgo concuerda con lo reportado por Darwish y Asfour, (1). Lamentablemente, no fue posible realizar la identificación a nivel de especies de *Staphylococcus coagulasa* negativa y es importante destacarlo debido a que, se han observado diferencias en la producción de limo entre especies de SCN (12), siendo *S. epidermidis* la especie que tiende a ser más productora, así lo observó Oliveira y cols. (27)

quienes incluso obtuvieron resultados idénticos de producción de limo en *S. aureus* (37,5%) y *S. epidermidis* (37,5%) implicados como agentes causales de mastitis bovina, concluyendo los autores que la producción de limo era común en ambas especies.

La mayoría de los aislamientos de *S. aureus* (91%) y SCN (74%) resultaron ser formadoras de biopelícula. Resultados similares a los expresados por Milanov y cols. (26) (100%) y Fabres-Klein y cols. (11) (87,5%) en *S. aureus* asociados a mastitis subclínica. Para SCN mastitogénicos, Tremblay y cols. (18) reportaron un 85,1% de positividad en la prueba de biopelícula. Cabe resaltar que, las cepas de *S. aureus* fueron principalmente fuerte productoras de biopelícula, en concordancia con lo observado por Darwish y Asfour (1) y da Costa y cols. (30). De igual forma, los SCN también se caracterizaron por ser fuertes productores de biopelícula. Usando un ensayo similar, Tremblay y cols. (18) y da Costa y cols. (30) observaron lo opuesto: la mayoría de los aislamientos de SCN asociados a mastitis subclínica fueron débil productores de biopelícula.

Varios estudios, han señalado que las cepas productoras de biopelícula son más

virulentas que las cepas no productoras, debido a que las cepas productoras tienen mayor capacidad de colonizar los tejidos del huésped entre ellos, la glándula mamaria (31-34).

Es importante mencionar que, de los 35 aislamientos de SCN que fueron productores de biopelícula, el 60% (21/35) no formaron limo. Este resultado sugiere que, probablemente la matriz de la biopelícula en SCN está conformada en su mayoría por proteínas y ADN extracelular y en menor grado por PIA, en concordancia con lo descrito previamente por Tremblay y cols. (18). Por el contrario, el 81% de las cepas de *S. aureus* que fueron productoras de biopelícula, al mismo tiempo formaron limo (58/72), este resultado puede estar relacionado con un mayor porcentaje de PIA en la composición de la matriz de la biopelícula en *S. aureus* (15).

La presencia del gen *icaA* en el 65% de las cepas analizadas de *S. aureus* puede considerarse bajo si se comparan con los resultados obtenidos por Melo y cols. (16) que reportaron un 95% de positividad para el gen *ica*, por su parte, Fabres-Klein y cols. (11) y Szweida y cols. (17) refirieron que el 100% de las cepas de *S. aureus* mastitogénicas presentaban el gen *ica*. Una posible explicación para esta discrepancia podría estar relacionada con los genes *ica* investigados. En este estudio se consideró solo el gen *icaA*, mientras que, en los trabajos ya referidos los investigadores incluyeron los genes *icaA* e *icaD*.

La baja detección del gen *icaA* en SCN (11%), también ha sido reportada por Darwish y Asfour (1) y Piessen y cols. (35). Por el contrario, Tremblay y cols. (18) en SCN provenientes de mastitis bovina en Canadá obtuvieron un 52,5% de cepas positivas para el gen *icaA*. La diferencia en los resultados puede ser atribuida al tipo de cebador utilizado para la amplificación del gen *icaA*. En nuestro caso se utilizó un cebador del gen *icaA* de *S. aureus*,

mientras que en el estudio de Tremblay y cols. (18) se usó un cebador de *icaA* de *S. epidermidis* siendo este más específico para amplificar *icaA* en SCN. La variación en la secuencia del ADN puede conducir a que la amplificación del gen en algunos aislamientos no se efectúe y arroje un resultado falso negativo.

La mayor detección del gen *icaA* en los aislamientos de *S. aureus*, en comparación con las cepas de SCN ha sido reportada previamente por Darwish y Asfour (1). La alta frecuencia de gen *ica* en *S. aureus* implicados en mastitis subclínica (11,17) al compararse con cepas de *S. aureus* de origen extramamario (36), destacan la utilización del gen *ica* como un marcador de la virulencia en *S. aureus* (28).

Cabe destacar, que de las 107 cepas de *Staphylococcus* spp. que fueron productoras de biopelícula (72 *S. aureus*, 35 SCN), el 50% (54/107) fueron negativas a la detección del gen *icaA* [*S. aureus* 33% (24/72), SCN 86% (30/35)], este resultado puede ser indicativo de que la producción de biopelícula se llevó a cabo por otros genes asociados a biopelícula y que no fueron probados en este estudio como el gen *icaD*, *bap* y genes de adhesión (18).

En conclusión, un alto porcentaje de las cepas de *S. aureus* se caracterizaron por ser portadoras del *icaA* y además se demostró la capacidad que tenían en producir biopelícula y limo. En el caso de SCN, se demostró su capacidad de formación de biopelícula el cual probablemente se lleve a cabo mediante un proceso independiente del gen *icaA*. Estos resultados deben ser considerados como relevantes si tenemos presente el papel de la biopelícula en la adherencia y la colonización del epitelio de la glándula mamaria y en la evasión de las defensas inmunológicas del hospedador hechos que dificulta la erradicación del patógeno y favorecen las infecciones persistentes.

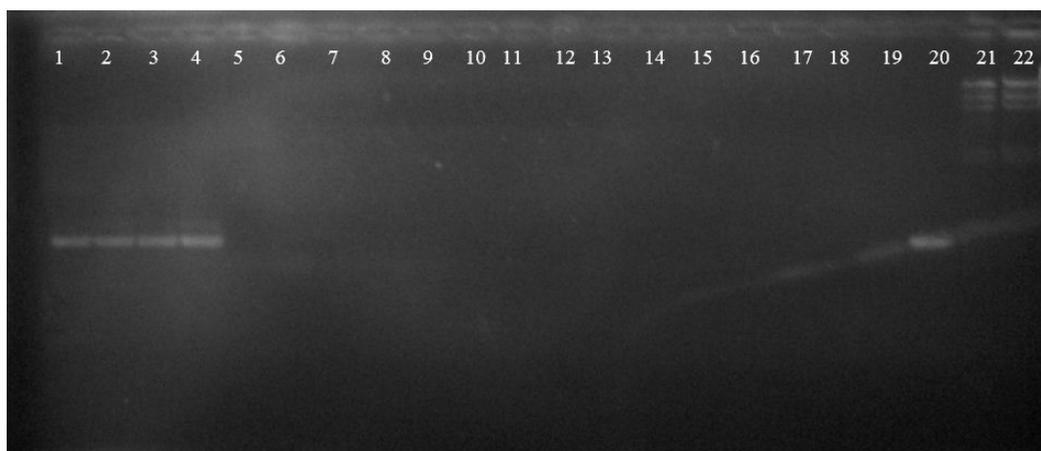


Figura 1. PCR simple para la detección del gen *icaA*. Los carriles de 1 al 4 y 20 amplificaron para el gen *icaA* (1,2 kb), los carriles 5 al 19 no amplificaron para el gen *icaA*, carril 21 y 22 marcador de peso molecular (λ HindIII: 564-23130 pb).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Darwish S, Asfour H. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The Scientific World Journal*. 2013, Article ID 378492, 9 pages, 2013. doi:10.1155/2013/378492
- (2) Ferraro L, Scaramelli A, Troya H. Prevalencia de la mastitis subclínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica. *Rev Cientif FCV-LUZ*. 1999; IX: 81-90.
- (3) Scaramelli A, Ferraro L, Troya H. Recuento electrónico de células somáticas aplicado a la detección de mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de los estados Aragua y Carabobo. *Rev Cient FCV-LUZ*. 1999; IX: 6. 508-518.
- (4) Valero K, Valbuena E, Chacón F, Olivares Y, Castro G, Briñez W. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Rev Cient FCV-LUZ*. 2010; XX: 498-505.
- (5) Sears P, McCarthy K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*. 2003; 19: 171-185.
- (6) Faría J, García A, D'Pool G, Valero K, Allara M, Angelosante G. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual y mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. *Rev Cient FCV-LUZ*. 2005; XV: 109-118.
- (7) Dhanawade N, Kalorey D, Srinivasan R, Barbuddhe S, Kurkure N. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun*. 2010; 34:81-89.
- (8) Arciola C, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clinical Microbiol*. 2001; 39: 2151-2156.
- (9) Krukowski H, Szymankiewicz M, Lisowski A. Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Pol J Microbiol*. 2008; 57:253-5.
- (10) Schlegelová J, Babák V, Holasová M, Dendis, M. The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia Microbiol*. 2008; 53:500-504.
- (11) Fabres-Klein MH, Caizer MJ, Contelli K, de Souza G, de Oliveira B. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*. 2015; 16.

- (12) Simojoki H, Hyvönen P, Plumed Ferrer C, Taponen S, Pyörälä S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Microbiol.* 2012; 158: 344–352.
- (13) Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol.* 2004; 103: 241–247.
- (14) Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318–1322.
- (15) Camussone C, Calvino L F. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes Inmunógenos. *Rev Argent Microbiol.* 2013; 45:119-130.
- (16) Melo de C, Ferreira L, Nader Filho, Zafalon Luiz, Vicente H, Souza V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J Microbiol.* 2013; 44: 119-124.
- (17) Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. Biofilm Production and Presence of *ica* and *bap* Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis in the Eastern Poland. *Polish J Microbiol.* 2012; 61: 65–69.
- (18) Tremblay Y, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci.* 2013; 96:234–246.
- (19) Valero-Leal K, Rivera-Salazar J, Valbuena E, Boscán L, Valeris R, Castro G, Briñez W. Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. *Rev Cient FCV-LUZ.* 2012; XXII: 303 – 314.
- (20) Freeman D, Faikiner F, Keane C. New method for detecting “slime” production by Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989; 42: 522-526.
- (21) Christensen G, Simpson W, Younger J, Baddour L, Barrett F, Melton D, 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: 996-1006.
- (22) Manijeh M, Mohammad J, Kermanshashi K. The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. *Res J Micobiol.* 2008; 3:181-186.
- (23) Kiem S, Sup Oh W, Ran Peck K, Lee N, Lee Y, Song J et al. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *J Korean Med Sci.* 2004; 19:779-782.
- (24) Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidam J, Smith J et al. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. Vol. 2. Fifth edition. John Wiley & Sons, Inc. USA. 2002.
- (25) Ciftci A, Findik A, Onuk E, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Braz J Microbiol.* 2009; 40:254-261.
- (26) Milanov D, Lazi S, Vidic B, Petrovic J, Bugarski D, Seguljev Z. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Veter (Beograd).* 2010; 60: 217-226.
- (27) Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco L, Bernardo F. et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 2006; 118: 133-140.
- (28) Vasudevan P, Mohan M, Annamalai T, Venkitanarayanan K. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 2003; 92: 179-185.
- (29) Arciola C, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus*

- epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*. 2002; 23: 4233-4239.
- (30) da Costa K, Santos A, Veneroni G, de Lima S, da Costa M, Mota R. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2015; 47:511-8.
- (31) Aguilar B, Amorena B, Iturralde M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2001; 78:183-191.
- (32) Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect. Immun*. 1993; 61: 4857-4862.
- (33) Cucarella C, Torlma M, Ubeda C, Trotonda M, Monzon M, Peris, et al. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004; 72: 2177- 85.
- (34) Melchior M, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilm: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J*. 2006; 171: 398-407.
- (35) Piessens V, De Vlieghe S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, et al. Characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from cows' milk and environment based on bap, icaA, and mecA genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *J Dairy Sci*. 2012; 95:7027-38.
- (36) Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*. 2005; 107: 295-299.
- (37) Aslantas Ö, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci*. 2016; 99: 8607-8613.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

Kasmera

Revista del Departamento de
Enfermedades Infecciosas y Tropicales

Vol. 45 N° 1, Enero - Junio 2017

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en diciembre de 2016, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve