

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

“ATRIBUTOS DE ADHERENCIA, FORMACIÓN DE BIOFILM Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA de *Staphylococcus aureus* ASOCIADOS A MASTITIS SUBCLÍNICA”

por

**Bettiana IZQUIERDO HERNÁNDEZ
Virginia MECOL CAMARGO
Viviana NARBAIZ PARENTELLI**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, inspección, control y tecnología de los alimentos de origen animal. Producción animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Dra. Cristina López

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Rosario de los Santos

Tercer Miembro:

Dr. Darío Hirigoyen

Co-tutores:

Dr. Álvaro González

.....

Lic. Paola Scavone

Autores:

Br. Bettiana Izquierdo

.....

Br. Virginia Mecal

.....

Br. Viviana Narbaiz

Fecha: 20 de Julio de 2015

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias, por el apoyo incondicional y la motivación en los momentos difíciles.

A Rosario y Álvaro, por la dedicación, la enseñanza y el cariño. A Pablo, Paola y Victoria, Dpto. de Microbiología del IIBCE.

A los compañeros del Dpto. de Ciencia y Tecnología de la Leche, por el apoyo, y compañerismo.

A nuestros compañeros tesistas Ignacio, Gonzalo y Martin, por su ayuda y los momentos compartidos.

A Rodrigo Puentes y al Dpto. de Inmunología de la Facultad de Veterinaria.

A Ariel Aldrovandi por su tiempo dedicado.

A Andrés Gil y José Piaggio por su colaboración.

A Rosina y Alejandra de sección Biblioteca por la paciencia y colaboración.

A PLANISA, por la financiación del proyecto.

Por ultimo pero no menos importante a nuestros amigos, amigas y compañeros de Facultad, por los momentos vividos en estos años.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
SUMMARY	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
Sector lechero en el Uruguay.....	10
Mastitis Bovina.....	11
Mastitis bovina asociada a <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	15
Biofilms	16
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Aislamientos bacterianos.....	26
Atributos de adherencia	27
Determinación de genes asociados a la capacidad de formación de biofilm	28
Producción de biofilm en diferentes medios de cultivo.....	31
Caracterización de la formación del biofilm en el tiempo	33
Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas	33
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y mínima bactericida (CBM) en células planctónicas.....	34
Concentración inhibitoria mínima y concentración mínima de erradicación de Biofilm en BHI y leche UHT descremada.....	35
RESULTADOS.....	37
Hidrofobicidad	37
Autoagregación.....	37
Formación de limo.....	38
Determinación de genes asociados a la capacidad de formación de biofilm	39

Formación de Biofilm en diferentes medios de cultivo	39
Caracterización de la formación del biofilm en el tiempo	41
Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas	42
Determinación de la concentración inhibitoria mínima y mínima bactericida en células planctónicas	43
Concentración inhibitoria mínima y concentración mínima de erradicación de Biofilm en BHI y leche UHT descremada	44
DISCUSIÓN.....	45
Hidrofobicidad	45
Autoagregación	45
Formación de limo.....	46
Determinación de genes asociados a la capacidad de formación de biofilm	46
Formación de Biofilm en diferentes medios de cultivo	48
Caracterización de la formación del biofilm en el tiempo	50
Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas	51
Concentración inhibitoria mínima (CIMB) y concentración mínima de erradicación de Biofilm (CEMB) en Leche y Medio de cultivo	54
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Cuadro I. Primers utilizados para la detección de genes asociados a la formación de biofilm.	30
Cuadro II. Componentes de la mezcla final empleada en la técnica de PCR....	31
Cuadro III. Concentraciones de antibióticos utilizadas para realizar los ensayos de CIM y CBM de los aislamientos en estudio (Factor de dilución 0,5)	35
Cuadro IV. Porcentaje de hidrofobicidad en los aislamientos de <i>S. aureus</i> asociados a mastitis subclínica (MSC) en diferentes medios de cultivo	37
Cuadro V. Porcentaje de autoagregación de los aislamientos de <i>S. aureus</i> asociados a MSC en TSB glucosa al 1%.	38
Cuadro VI. Análisis de varianza: resultados de la variable DO asociada a medio de cultivo, cepa y tiempo y la interacción medio de cultivo tiempo.	40
Cuadro VII. Formación de biofilm en 12 hs y su clasificación según lo propuesto por Stepanovic et al. 2007.	40
Cuadro VIII. Formación de biofilm en 24 hs y su clasificación según lo propuesto por Stepanovic et al. 2007.	41
Cuadro IX. Susceptibilidad antibiótica de los aislamientos de <i>S. aureus</i> asociados a MSC.....	42
Cuadro X. Concentración mínima inhibitoria (CIM) de las células planctónicas ($\mu\text{g/mL}$) para los antibióticos en estudio	43
Cuadro XI. Concentración mínima bactericida (CBM) de las células planctónicas ($\mu\text{g/mL}$) para los antibióticos en estudio	43
Cuadro XII. Concentración inhibitoria mínima del biofilm producido por las cepas en estudio en leche descremada UHT.....	44
Figura 1. Representación esquemática del proceso de formación de un biofilm. Imagen modificada, tomada de Otto, 2008.	18
Figura 2. Clasificación de las cepas según su DO (Stepanovic et al., 2007).....	32
Figura 3. Formación de limo en las cepas ensayadas.	38
Figura 4. Resultados de PCR para los genes <i>lcaD</i> , <i>fnbpA</i> y <i>bap</i> de los aislamientos de mastitis subclínica	39

Figura 5. Imágenes de la producción de biofilm de la cepa 090333 en leche descremada UHT (microscopia confocal de fluorescencia)..... 41

Figura 6. Antibiograma de *S. aureus* realizado mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. 42

RESUMEN

La lechería uruguaya ha sido en los últimos años uno de los sectores más dinámicos de la agropecuaria nacional. Las altas demandas incrementan drásticamente la producción pero también los riesgos de aparición de ciertas enfermedades asociadas. La mastitis, inflamación de la glándula mamaria, se identifica aún como la enfermedad más costosa de los productores lecheros de todo el mundo. El 80% de los casos de mastitis bovina subclínica son ocasionados por la invasión de microorganismos patógenos. En Uruguay *Staphylococcus aureus* es uno de los más importantes agentes de mastitis subclínica bovina. Entre las principales estrategias de sobrevivencia que *S. aureus* es capaz de emplear tanto en medios naturales como industriales se encuentra la formación de biofilms. Estos son comunidades bacterianas sésiles que se hayan embebidas en una matriz extracelular polimérica autosecretada. Los mecanismos de formación de biofilm de *Staphylococcus* son complejos, con participación de muchos tipos de proteínas por lo que muchos genes están involucrados. Además se estima que los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de mastitis bovinas son altamente resistentes a los agentes antimicrobianos cuando crecen en biofilms, incluso algunos autores sugieren que concentraciones inhibitorias subliminales de antibióticos inducen en algunas cepas la formación de biofilm. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de adherencia y formación de biofilms por *S. aureus* provenientes de leche cruda de vacas con mastitis subclínica así como sus características topomorfológicas y de susceptibilidad antibiótica. Para ello se utilizaron 3 aislamientos de *S. aureus* provenientes de leche de vacas con mastitis subclínica de tambos situados en la cuenca lechera de nuestro país. Los atributos de adherencia estudiados fueron: el porcentaje de hidrofobicidad, autoagregación, la formación de limo y la producción de Biofilm (en medio de cultivo y leche). Además de los estudios fenotípicos, se determinó la presencia de algunos genes asociado a la formación de Biofilm (*IcaD*, *fnbpA* y *bap*). Por otra parte, la susceptibilidad a los antibióticos penicilina-estreptomicina, sulfametoxina-trimetropima y gentamicina fue estudiada en las células planctónicas y en biofilms producidos en medio de cultivo y leche en 24hs de crecimiento. Los resultados obtenidos indican altos porcentajes de hidrofobicidad y autoagregación de los aislamientos. Todas las cepas produjeron limo y resultaron formadoras de biofilm. Existieron diferencias significativas entre la formación de Biofilm en medios de cultivo y en leche. Todos los aislamientos fueron positivos para la presencia del gen *fnbpA*, ninguno presento gen *IcaD* y dos aislamientos fueron positivos para el gen *bap*. Las cepas planctónicas fueron sensibles a los antibióticos en estudio, pudiéndose determinar las concentraciones inhibitorias mínimas y bactericidas (CIM y CBM). Las concentraciones inhibitorias mínimas de biofilm (CIMB) producido en leche se determinaron para los antibióticos penicilina-estreptomicina y gentamicina resultando entre 20-80 veces y 8-16 veces mayores a las inhibitorias de las células planctónicas respectivamente. Con respecto a la concentración mínima de erradicación del biofilm (CMEB) no fue posible determinarla en las condiciones estudiadas.

SUMMARY

Uruguayan dairy has been one of the most dynamic sectors of the national agriculture in recent years. High demands dramatically increase the production but also the risks of developing certain associated diseases. Mastitis, inflammation of the mammary gland, is still identified as the most expensive disease of dairy producers worldwide. 80% of cases of subclinical bovine mastitis are caused by invading pathogens. *Staphylococcus aureus*, in Uruguay, is one of the most important agents of subclinical bovine mastitis. Among the main survival strategies that *S. aureus* is able to use both natural and industrial media is biofilms formation. These are sessile bacterial communities that have been embedded in a polymeric self-secreted extracellular matrix. *Staphylococcus* biofilm formation mechanisms are complex involving many types of proteins therefore many genes are involved. Furthermore it is estimated that *S. aureus* isolations obtained from bovine mastitis are highly resistant to antimicrobial agents when grown in biofilms, even some authors suggest that subliminal inhibitory concentrations of antibiotics in some strains induce biofilm formation. The aim of this study was to evaluate the ability of adhesion and biofilm formation by *S. aureus* from raw milk from cows with subclinical mastitis and their topo-morphological and antibiotic susceptibility characteristics. We used 3 *S. aureus* isolations from milk of cows with subclinical mastitis in dairy farms located in the dairy region of our country. Adhesion attributes studied were: 1) percentage of hydrophobicity; 2) auto-aggregation; 3) the formation of slime and biofilm production (in culture medium and milk). In addition to phenotypic studies, the presence of some genes associated with biofilm formation (*icaD*, *fnbpA* y *bap*) was determined. Moreover, susceptibility to antibiotics penicillin-streptomycin, and gentamicin sulfametoxina-trimethoprim was studied in planktonic cells and biofilms produced in culture medium and 24 hours of growth in milk. The results indicate high percentages of hydrophobicity and self-aggregation of the isolates. All strains were produced slime and biofilm forming. There were significant differences between Biofilm formation in culture media and in milk. All isolations were positive for the presence of gene *fnbpA*, none had *icaD* gene and two isolations were positive for the gene *bap*. Planktonic strains were sensitive to antibiotics in the study, being able to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC). The minimum inhibitory concentrations of biofilm (CIMB) produced in milk were determined for penicillin-streptomycin and gentamicin antibiotics resulting 20-80 times and 8-16 times greater than inhibitory planktonic cells respectively. We could not determine the minimum biofilm eradication concentration (CMEB) under the conditions studied.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Sector lechero en el Uruguay

La lechería uruguaya ha sido en los últimos años uno de los sectores más dinámicos de la agropecuaria nacional. Así, ha alcanzado un desarrollo sostenido en productividad y calidad siendo el segundo país con mayor crecimiento en el sector lechero y además el que tiene el mayor consumo *per cápita* de lácteos (250 litros/año). Actualmente existen aproximadamente 3200 productores remitiendo a la industria, 2300 millones de litros de leche se producen cada año, 70% de la producción se exporta y el 30% se destina al consumo interno (INALE 2014). En el año 2013 se remitió a planta un 5,7% más que el año anterior y se esperan crecimientos superiores para el año en curso, lo que demuestra claramente el crecimiento acelerado del sector en nuestro país (FFDSAL, DIEA, 2014). El sector, abarca 857.000 hectáreas de la superficie de nuestro territorio, siendo una gran fuente de mano de obra que emplea a 19 trabajadores por cada 1000 hectáreas (DIEA, 2011). El productor lechero debe lograr contrarrestar el crecimiento de la agricultura, el cual ha logrado desplazarlo hacia zonas más marginales, y para ello debe intensificarse, ya sea mediante el aumento de la producción individual o aumentando el número de vacas por hectárea.

Es importante destacar, que al momento de entregar este trabajo, la lechería en Uruguay se encuentra en una importante crisis debido a la baja de los precios internacionales de los lácteos, la falta de mercados, la crisis forrajera causada por las sequías y los problemas que enfrentan los productores para mantener los altos costos de producción a lo que se suma el cierre de dos importantes empresas: Ecolat y Schreiber Foods. De tal manera el sector lechero no mantendría el ritmo de crecimiento esperado y estaría en una fase de contracción.

Intensificación de la producción y sus consecuencias

Las altas demandas hacen que se incremente drásticamente la producción por ello es importante destacar que en la misma medida en que se desarrolla la ganadería y se obtienen rodeos de mayor potencial genético y especialización productiva, también se incrementan los riesgos de aparición de alteraciones en la composición de la leche, asociadas a ciertas enfermedades, pues se aumentan las exigencias ambientales, nutricionales y de manejo (Montero, 2001). El desafío consiste, en que a pesar de que las exigencias en el metabolismo de los animales aumenten, la implementación de un buen manejo permita que la incidencia de las enfermedades ligadas a la producción se mantenga estable (LeBlanc et al., 2006). La posible relación entre estos trastornos y los cambios indeseables en los parámetros de normalidad establecidos para el pago al productor y el cumplimiento de la alta exigencia de calidad de la materia prima en la industria, ha dado lugar a investigaciones a nivel mundial. La mastitis se identifica aún como la enfermedad más costosa de los productores lecheros de todo el mundo (Cressier y Bissonnette, 2011). Presentando un profundo impacto en el bienestar animal y en la calidad de la leche producida (Hillerton y Berry, 2005; Le Maréchal et al., 2011).

Mastitis Bovina

La mastitis ocasiona para la industria lechera, pérdidas económicas que se calculan en los EEUU en unos U\$S 185 /vaca /año. Las pérdidas son debidas al descarte de leche, a las horas hombre destinadas al manejo de los animales enfermos, al costo de la antibioticoterapia, los servicios veterinarios y a la disminución de la producción de las vacas con mastitis subclínica (2/3 de las pérdidas debidas a la mastitis). De hecho, un solo cuarto enfermo durante la lactancia hace que la producción de leche se reduzca entre un 10 y un 12 % (Seegers et al., 2003).

El término mastitis deriva de las palabras griegas mastos (mama) e itis (inflamación). La mastitis, como su nombre lo indica, constituye una reacción inflamatoria de la glándula mamaria de origen multifactorial (IDF., 1981). Puede ocurrir en forma primaria como respuesta de la glándula a una infección intramamaria (IMI), frecuentemente de origen bacteriano o por diferentes agentes como lesiones traumáticas, disturbios secretorios de origen metabólico-nutricional, situaciones de estrés, cambios fisiológicos asociados con una terminación temprana de la lactancia y menos frecuente, por alergias, entre otros (Philpot y Nickerson, 1993; National Mastitis Council, 2004).

La mastitis bovina puede clasificarse de acuerdo al grado de la inflamación y a las lesiones locales e implicaciones sistémicas en la vaca. En términos generales, se clasifica en mastitis subclínica y mastitis clínica.

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento. Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Apenas se percibe una reducción en la producción de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias (Gallegos y Moncada, 2011). Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero; Ocorre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas no solo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche (Ariznabarreta et al., 2002). En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (Wellenberg et al., 2002). Para identificar estos casos de mastitis es necesario utilizar técnicas de laboratorio como el conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico (Sixtos, 2011).

En los casos en que la inflamación de la ubre es acompañada de signos clínicos es diagnosticada entonces como mastitis clínica (Djabri et al., 2002). Esta se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente (Heringstad et al., 2000). La mastitis clínica puede presentarse de forma aguda y se caracteriza por su aparición súbita. En la forma crónica, se presenta una infección de larga duración, con

leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre (Schrick et al., 2001).

La magnitud con la cual se desarrolla una inflamación en la ubre está influenciada por el tipo de bacteria, los días en lactancia, la edad, la genética y el estado nutricional de la vaca (Harmon, 1994). El 80% de los casos de mastitis bovina subclínica (MSC) son ocasionados por la invasión de microorganismos patógenos. La virulencia del microorganismo involucrado es muy importante en el establecimiento de la enfermedad, así como la susceptibilidad del animal a las infecciones, la cual está determinada por la interacción de varios factores (Andresen, 2001).

Muy pocas bacterias son necesarias para entrar al canal del pezón y establecer una infección dentro de la glándula mamaria. Una vez que los microorganismos se encuentran presentes en la leche, son transmitidos fácilmente a otros cuartos de la misma vaca u otras vacas por medio de las manos del ordeñador, pezoneras y otras partes del equipo. Por lo tanto la prevención debe enfocarse en detener la invasión de la ubre por organismos y en prevenir su diseminación de una vaca a otra. La limpieza general de las vacas y las instalaciones, como también buenos procedimientos de manejo (especialmente durante el ordeño) son formas efectivas de controlar la propagación de la mastitis (Tessi et al., 1981; López Meza et al., 2006).

Mastitis bovina asociada a *Staphylococcus aureus*

La mastitis bovina, en especial la causada por *Staphylococcus aureus*, continúa siendo un tema de preocupación para los productores de leche y los asesores en planes de prevención y control de esta enfermedad en todo el mundo.

En Uruguay, existen varios estudios de la prevalencia de bacterias causantes de mastitis subclínica que datan desde los años 70 y principios de los 80. Constatándose una evolución de los casos de mastitis por *S. aureus* desde principio de los años 70 a la actualidad, posiblemente debidos al uso generalizado de la máquina de ordeño y a las medidas de control implementadas durante el mismo a efectos de minimizar el contagio durante el mismo. (Bouman et al., 1999). Ya en el siglo XXI, Giannechini et al. (2002) determinaron, que en el caso de las mastitis clínicas el patógeno mayoritario fue *S. aureus* (37.5%) sin embargo, en el caso de mastitis subclínicas, ese porcentaje alcanzaba el 62.8%. Esta situación también se refleja a nivel mundial ya que *S. aureus* es uno de los más importantes agentes de mastitis subclínica bovina (Brito et al., 2003).

S. aureus es una bacteriana Gram positiva con forma de coco de 0,5-1,5 μm de diámetro, que se dividen en más de un plano y se agrupa irregularmente en racimos. Son inmóviles y anaerobios facultativos. Posee cápsula y carecen de esporas. Productor de la enzima catalasa y no productor de la enzima oxidasa. Forma colonias grandes y lisas en 24 horas, su pigmentación es amarillenta causada por carotenoides. Es capaz de soportar elevadas concentraciones de cloruro de sodio y fermentar el manitol. En agar sangre, crece bien dando hemólisis completa. Produce varias toxinas y son oportunistas y ubicuos. Es una especie sensible a la acción del calor (no así su enterotoxina que es termorresistente) y a los desinfectantes en particular cuando se

encuentra en forma de vida planctónica (Pascual, 1992; Murray et al., 1997). Naturalmente habita la piel y mucosas. Es extremadamente versátil, responsable de un amplio espectro de enfermedades del hombre y los animales (O’Riordan y Lee, 2004) debido a su habilidad de producir una amplia variedad de arreglos combinando los factores de virulencia de su genoma, cuya expresión responde a señales medioambientales (Begun et al., 2005).

Los reservorios de *S. aureus* en el tambo son los cuartos infectados así como la piel del pezón y las mamas. La infección desde una a otra mama ocurre durante el ordeño. Las fuentes de contaminación son el hombre, sus manos, su ropa y el equipo de ordeño. A la ordeñadora llegan cepas que provienen de la piel y de la leche, pero los estudios han demostrado que la fuente de infección intramamaria más relevante en el rodeo lechero, es la leche proveniente de animales infectados (Zadoks et al., 2002). Una vez que *S. aureus* llega al orificio del pezón puede persistir, reproducirse y progresar hacia la glándula mamaria. Para adherirse a las células epiteliales de la glándula se llevan a cabo interacciones físico químicas no específicas y específicas entre las células de huésped y los receptores de la pared bacteriana. La bacteria se adhiere al epitelio ductal y alveolar y comienza a producir toxina. Esto provoca la llegada de macrófagos y neutrófilos que migran desde la sangre a la leche (incrementando el recuento de células somáticas en leche) generando la inflamación de la glándula mamaria lo cual afecta el sistema inmune del huésped y daña las células epiteliales. Como resultado, la bacteria alcanza la capa basal sub epitelial uniéndose al fibrinógeno y otras proteínas receptoras del huésped y finalmente establecen una infección que muchas veces se vuelve crónica (Cucarella et al. 2004).

La terapia antimicrobiana en el período seco así como durante la lactancia, forma parte de las estrategias frecuentemente utilizadas por veterinarios y productores para el control de la misma. Los reportes de curación en los casos de mastitis producida por *S. aureus* varían considerablemente, esto es debido a que la probabilidad de éxito depende de diferentes factores, entre ellos, la vaca, el patógeno y los tratamientos instaurados (Bakerma et al., 2006).

Factores relacionados al animal

Entre los factores relacionados al animal, diversos autores afirman que el número de cuartos afectados es un gran predictor del nivel de curación de una vaca durante la lactancia, cuantos más cuartos afectados tenga el animal menor va a ser la probabilidad de curarlo (Osteras et al., 1999). Así como también se afirma que afecciones de cuartos traseros son menos curables que afecciones de cuartos delanteros (Bakerma et al., 1997,1998). Por otra parte, el número de pariciones y lactancias es otro factor importante a la hora de curar un animal con mastitis subclínica. Así es que, a mayor número de partos menor es la probabilidad de cura del animal y también a mayor número de RCS en leche luego de instaurado el tratamiento, disminuye la posibilidad de cura, (Owens et al., 1997, Pyörala and Pyörala, 1998; Osteras et al., 1999; Taponen et al., 2003).

Factores relacionados al patógeno

En la mayoría de los rodeos lecheros existe una cepa predominante de *S. aureus* que por su naturaleza contagiosa sobrevive bajo la presencia de otras cepas del patógeno (Zadoks et al., 2002). *In vivo* las cepas difieren en su capacidad de diseminarse en el rodeo (Smith y Hogan, 1998), en su habilidad para producir un aumento en el RCS, en su capacidad de manifestar signos clínicos de mastitis, infecciones persistentes (Zadoks et al., 2002; Haveri et al., 2005) o disminución en la producción de leche (Middleton y Fox, 2001). *In vitro* las cepas difieren en su habilidad para evadir a los neutrófilos (Mullarky et al., 2001), invadir las células del epitelio mamario o su capacidad de formación de biofilms (Fox et al., 2005)

La formación de biofilms y la capacidad de penetrar en las células del epitelio mamario se consideran formas de protección del *S. aureus* frente a la respuesta del sistema inmunitario del huésped así como también frente a la terapia antimicrobiana, haciendo a la bacteria inaccesible para estos, excepto en el caso de los antibióticos que llegan al interior de la célula como por ejemplo los macrólidos (Lammers et. al, 1999; Kerro Deogo et al., 2002; Vasudevan et al., 2003; Cucarella et al., 2004).

Factores relacionados al tratamiento

S. aureus es susceptible a una variedad de antibióticos *in vitro*, sin embargo los productores relatan que esta susceptibilidad no se repite al utilizarlos en la práctica clínica diaria. Diversos factores incluyendo la habilidad para sobrevivir en el interior de los neutrófilos, para formar pequeñas colonias (Owens et al., 1997; Brouillette et al., 2003), inducir la fibrosis y la formación de microabcesos (Erskine et al., 2004), e invadir las células del epitelio mamario (Lammers, 2000; Kerro Deogo et al., 2002) son posibles contribuyentes a la resistencia de *S. aureus* frente a la terapia antimicrobiana habitual.

Una razón obvia para la falla en las terapias antimicrobianas es la resistencia que presenta el *S. aureus* frente a los antimicrobianos de uso diario. La elección del tratamiento se debe basar en el conocimiento de la sensibilidad de la cepa presente, que puede ser obtenido a través de pruebas de sensibilidad clínica cuyos resultados pueden ser utilizados para tratamientos posteriores en casos de mastitis (Robertson, 1994). La elección de antibióticos para el tratamiento de las mastitis basados en pruebas de sensibilidad *in vitro* no garantiza que el mismo sea exitoso *in vivo*, según un estudio las pruebas *in vitro* se pueden utilizar como un predictor de tratamiento para curar IMI de 2 semanas de duración pero no para el tratamiento de infecciones crónicas de más de 4 semanas de duración (Owens et al., 2007).

Aunque los valores obtenidos en las pruebas de sensibilidad para el tratamiento de mastitis son debatidos, algunos autores afirman que deben ser predictores a la hora de instaurar un tratamiento de mastitis clínica. Además algunos trabajos afirman que dichas pruebas de sensibilidad deben preceder al tratamiento, sobre todo en el caso de la mastitis subclínica, y que la elección de medicamentos inadecuados no debería ser una excusa para el fracaso del tratamiento cuando las pruebas de sensibilidad están disponibles (Barkema et al., 2006; Taponen et al., 2008).

Factores de virulencia de *S. aureus*

S. aureus es capaz de producir infección intramamaria, debido a la capacidad de expresar numerosos factores que incluyen:

- (1) Proteínas de superficie, que promueven la adhesión y la colonización de los tejidos del huésped y otros componentes extracelulares (Götz, 2002; Cucarella et al. 2004; Sibbald et al. 2006; Otto, 2008).
- (2) Invasinas que son exportadas a una localización extra citoplasmática y promueven la difusión en los tejidos (leucocidasas, hialuronidasas) (Cucarella et al., 2004; Sibbald et al., 2006).
- (3) Factores de superficie que inhiben la fagocitosis (cápsula y proteínas), y le permiten la supervivencia en las células que colonizan.
- (4) Propiedades bioquímicas que mejoran la supervivencia de *Staphylococcus* en la fagocitosis (producción de carotenoides y catalasa),
- (5) Enmascaradores inmunológicos (proteína A y factor de coagulación),
- (6) Toxinas de daño de membranas, que lesionan la membrana de células eucariotas (hemolisinas y leucotoxinas)
- (7) Determinantes para la resistencia inherente o adquirida a agentes antibióticos (Sibbald et al., 2006).

Propiedades de adherencia:

Las proteínas de la matriz extracelular y la adhesión a las células epiteliales son elementos clave para colonizar la glándula y desarrollar el proceso patógeno ya que *S. aureus* inicialmente debe entrar a través del canal del pezón y luego evadir el flujo descendente de leche durante el ordeño (Takamatsu et al., 2008). Los componentes de superficie contribuyen a la persistencia del *S. aureus* debido a su adherencia al tejido subepitelial. *S. aureus* utiliza diferentes proteínas de superficie para adherirse a varios componentes de la matriz extracelular (Sutra y Poutrel, 1994; Oliveira et al., 2006; Takamatsu et al., 2008). El polisacárido capsular forma una estructura lábil extra capsular, el limo, cuya función se halla vinculada a la adherencia, la colonización y virulencia de las cepas que lo presentan (Baselga et al., 1993). El limo (slime) es una capa de proteínas y polisacáridos que rodea las bacterias de ciertas cepas de estafilococos y de otras especies bacterianas, que son capaces de producirla bajo ciertas condiciones ambientales. Las bacterias se hallan inmersas en dicha matriz que, aunque no se encuentra fijada firmemente a la superficie celular (Beveridge y Graham, 1991), se encuentra vinculada a la adherencia a las superficies inertes (Giridhar et al., 1994; Cifrian et al., 1995), la colonización y virulencia de las cepas que lo presentan así como a la formación de Biofilm (Baselga et al., 1993). La adherencia a las superficies es una estrategia de supervivencia que permite a las bacterias instalarse y colonizar un ambiente particular, de modo que el estado planctónico podría reducirse al

paso de una superficie a otra, esto es, a la difusión, dentro de un ambiente particular, vivo o inerte. La importancia de la presencia de limo no sólo reside en que sea parcialmente responsable de la capacidad de adherencia a superficies inertes (Bayston y Penny, 1972; Christensen et al., 1982; Ziebuhr et al., 1999), sino a que puede interferir en la actividad de los fagocitos de los antibióticos o de las inmunoglobulinas con actividad anticuerpo, haciendo que las cepas productoras de limo sean más resistentes que sus variantes no productoras (Souto et al., 1989; Baselga et al., 1994).

Entre los factores de virulencia y de las principales estrategias de sobrevivencia que *S. aureus* es capaz de emplear tanto en medios naturales como industriales, se encuentra la formación de biofilms.

Biofilms

Hoy, más de 70 años después del primer reporte sobre biofilm realizado por Claude Zobell en 1943 este sigue siendo una preocupación en diversas áreas, específicamente en aquellas vinculadas a los alimentos, al ambiente y a la biomedicina. Este autor fue uno de los pioneros en el concepto de que los microorganismos se adhieren a la superficie y contribuyo al campo de la microbiología del biofilm durante toda su vida. En este sentido, es una tendencia natural de los microorganismos adherirse a superficies húmedas para multiplicarse e incluirse ellos en una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (autogenerada) formando un biofilm (Simões et al., 2010). Así es que las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas, de libre flotación, y bacterias en biofilm. En el año 2002, Donlan y Consterton definen al biofilm como una “comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”. Una pequeña fracción de las bacterias se halla en forma planctónica o de libre flotación, se postula que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico. Así es que desde la década de 1970, los microbiólogos plantearon que, probablemente, la mayor parte de las bacterias en la naturaleza existía en estado de biofilm.

En este contexto, toda comunidad microbiana desarrollada en biofilm es única en su género, aunque algunos atributos estructurales pueden, generalmente, ser considerados universales. El término biofilm es, en cierto modo, un nombre inapropiado, puesto que los biofilms no constituyen un depósito superficial de una monocapa continua. Los biofilms están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias sésiles embebidas en una matriz polimérica extracelular, la cual ayuda al fortalecimiento del nexo entre las bacterias y el sustrato, y estabiliza a la colonia del estrés medioambiental (Donlan, 2002) Las células bacterianas, que componen el 15-20% del volumen del biofilm, no se dividen en el interior, lo cual podría atribuirse al hecho de adoptar un fenotipo alterado, diferente al de las mismas bacterias en estado de libre flotación (Chole y Faddis, 2003). La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando a representar desde un 63% hasta el 97% de ésta (Donlan, 2002). Además de agua y

microorganismos, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), los que constituyen su componente fundamental, producidos por los propios microorganismos integrantes. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácidos Nucleicos y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). En la matriz también puede hallarse materiales no bacterianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos, según sea el medioambiente en el cual se desarrolla el biofilm. Pueden tener carga neutra o carga poli-aniónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitiría interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias (Post et al., 2004).

En cuanto a los microorganismos, los biofilms pueden encontrarse bajo dos formas, como colonias de una misma especie bacteriana (biofilm monoespecie) o de especies bacterianas diferentes (biofilm multiespecie).

Algunas infecciones que adoptan la estructura de biofilms se desarrollan lentamente en un principio no presentando no más que algunos pocos síntomas pero que actúan como reservorios de células bacterianas capaces de desencadenar cuadros agudos exacerbados (Donlan y Costerton, 2002). Muchas infecciones crónicas están asociadas con cepas productoras de biofilms, muy difíciles de eliminar por fagocitosis y resistentes a diversos antimicrobianos (Mittelman, 1998; Costerton et al., 1999; Cucarella et al., 2004). Las cepas productoras de biofilms poseen una capacidad de colonización superior cuando son comparadas con las cepas no productoras (Baselga et al., 1993). Las bacterias formadoras de biofilms ocasionan daños más pequeños y menos evidentes en el tejido de la glándula mamaria, sin embargo las bacterias no productoras de biofilms producen toxinas, son más patogénicas y en poco tiempo causan daños tisulares evidentes.

La arquitectura de la matriz no es sólida y las microcolonias se encuentra separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos, llamados canales de agua, que permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias ubicadas en su interior, incluso aquellas situadas en las zonas más profundas del biofilm. Asimismo estos canales constituyen un mecanismo para la remoción de productos de desecho metabólico (Donlan, 2006; De Beer et al., 1994). La existencia de estos no impide, sin embargo, que dentro del biofilm se encuentren ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Se genera, de esta manera, un gradiente de tensión de pH y de oxígeno, siendo metabólicamente más activas las áreas superficiales respecto a las más profundas. En estas últimas, las bacterias deben adaptarse a una disponibilidad reducida de oxígeno (De Beer et al., 1994; Sanderson et al., 2006).

Fases de la Formación de Biofilm:

La biología de los biofilms se centra en su ciclo vital e interacciones con el medio ambiente. El ciclo vital es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento o maduración y desprendimiento (Figura 1).

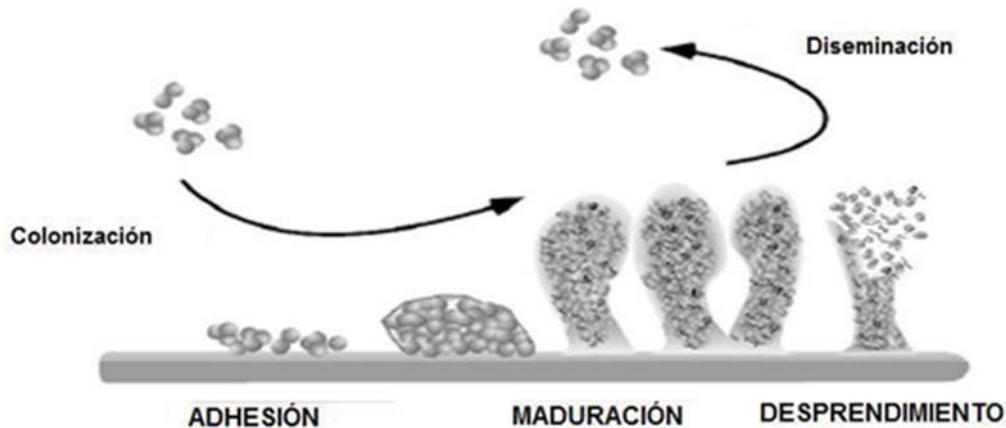


Figura 1: Representación esquemática del proceso de formación de un biofilm. Imagen modificada, tomada de Otto, 2008.

Durante la primera fase (adhesión), las bacterias, una vez percibida una superficie, proceden a formar una unión activa vía apéndices (como fimbrias, flagelos o pili) así como también mediante la expresión de determinadas proteínas de superficie. Mediante microscopía electrónica se ha descrito que las bacterias adheridas se encuentran conectadas a la superficie por medio de finas fibrillas poliméricas extracelulares. Las fimbrias, probablemente luego de superar la barrera de repulsión electrostática inicial que existe entre el microorganismo y el sustrato, contribuyen a la adhesión bacteriana (Donlan y Costerton, 2002). La motilidad, otorgada por flagelos, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente. Sin embargo, la motilidad no pareciera ser un requisito esencial, puesto que bacterias Gram positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también poseen la capacidad de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram positivas, como *S. aureus* se ha descrito, en esta primera etapa, la participación de proteínas de superficie. La adhesión de bacterias a una superficie ocurrirá más fácilmente en aquellas más ásperas, más hidrofóbicas, y recubiertas por “films condicionantes”. Se ha descrito que la colonización microbiana parece incrementar a medida que aumenta la aspereza de la superficie. Esto sería debido a que están reducidas las fuerzas de deslizamiento, y el área de superficie se torna mayor (Sanclement et al., 2005). Los films condicionantes (compuestos habitualmente de albúminas, lisozimas, glicoproteínas, fosfoproteínas, y lípidos) cubren inevitable y rápidamente la superficie de cualquier material que se encuentre en contacto con un líquido, y constituyen requisito indispensable para una

posterior adhesión microbiana. Un buen ejemplo en el hombre puede ser el film conocido como “película adquirida”, que se desarrolla en superficies del esmalte dental. (Thomas y Nakaishi, 2006). Las propiedades físico-químicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión. Se ha encontrado que las bacterias se adhieren más rápidamente a superficies hidrofóbicas, no polarizadas, como lo es el teflón y otros plásticos, en comparación con materiales hidrofílicos, como vidrio o metales. Aparentemente se produciría algún tipo de interacción hidrofóbica entre la superficie celular y la del sustrato que permitirían a la bacteria superar las activas fuerzas de rechazo a cierta distancia de la superficie del sustrato, y lograr adherirse irreversiblemente (Donlan y Costerton, 2002).

La segunda fase, de maduración o de crecimiento, es irreversible y está vinculada a la producción de sustancias importantes para la cohesión y la adherencia a la superficie. A medida que las células se agregan y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm, y éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras similares a setas (Ramadan, 2006). La composición del exopolisacárido es diferente para cada especie bacteriana (Lasa et al., 2005)

Finalmente, en la tercera etapa, o de desprendimiento celular ocurre en tres principales mecanismos: erosión o deslizamiento (remoción continua de pequeñas partes del biofilm), separación (remoción rápida y masiva) y abrasión (liberación por colisión de partículas del líquido circundante con el biofilm). La forma en que se produce la dispersión afectaría, aparentemente, las características fenotípicas de las bacterias. Los conglomerados desprendidos desde el biofilm conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas aisladamente podrían rápidamente volver a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los antimicrobianos (Donlan y Costerton, 2002). El desprendimiento puede ser resultado de: una disminución de los nutrientes, como respuesta a señales químicas entre las células bacterianas, a fuerzas externas al biofilm o de procesos activos inducidos por éste (Post et al., 2004; Clutterbuck et al., 2007). El mismo proporcionaría un mecanismo para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevos biofilms en sitios distantes (Donlan y Costerton, 2002; Scott y Manning, 2003).

Quorum sensing

Un avance importante en la comprensión de los biofilms ocurrió a comienzos de los años 90 con el descubrimiento de proteínas responsables del mecanismo de *quorum sensing* o de autoinducción. En los años siguientes se produjo una profusa publicación de nuevos conocimientos acerca de la genética de señalización célula-a-célula y translocación coordinada de genes responsables de factores de defensa y virulencia (Scott y Manning, 2003). La unión de los microorganismos a una superficie y posterior formación de un biofilm necesita que las bacterias se aseguren que han efectuado contacto. Para lograrlo requieren de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas. El desarrollo de interacciones célula a célula se facilita por la

estrecha proximidad existente entre las bacterias en el biofilm. Esta interrelación, denominada *quorum sensing*, beneficia a la bacteria al permitirle sentir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. El proceso *quorum-sensing* funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Una vez logrado esto, se inducen diferentes fenómenos en la bacteria, para finalmente desencadenarse la diferenciación en biofilm. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que esté presente un número adecuado de células bacterianas en la vecindad, los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios (Potera, 1999; Singh et al., 2000; Donlan y Consterton, 2002; Sanclement et al., 2005).

Genes asociados a la producción de biofilms (BAGs)

Los mecanismos de formación de biofilm de *Staphylococcus* son complejos y con la participación de muchos tipos de proteínas, y así muchos genes están involucrados. En los últimos años diversos grupos de investigadores han orientado sus esfuerzos intentando identificar tanto los genes responsables de la transición biofilm/planctónica, al igual que aquellos que están expresados únicamente en biofilms y que son indispensables para mantener su particular estructura. Las bacterias en biofilms poseen una expresión génica diferente respecto a sus contrapartes planctónicas, originando bacterias fenotípicamente distintas respecto a aquellas. Se ha encontrado que hasta el 30% de los genes puede expresarse de manera diferente entre la misma bacteria desarrollada en condiciones planctónicas o en un biofilm. Los biofilms hospedan un medioambiente muy dinámico, donde se intercambia material genético tal como plásmidos (ácido desoxirribonucleico extra cromosómico), enzimas y otras moléculas (Sanclement et al., 2005).

El biofilm producido por *S. aureus* y *S. epidermidis* se caracteriza por ser una matriz mucosa compuesta por exopolisacáridos, alrededor de varias capas de células. Muchos de los factores de virulencia se encuentran formando parte de elementos genéticos móviles tales como transposones, plásmidos, bacteriófagos, o bien, forman parte de regiones particulares del cromosoma bacteriano denominadas islas de patogenicidad (IP) (Cucarella et al., 2004). Para *S. aureus*, se han descrito dos genes involucrados en la producción del biofilm: a) el operón *icaADBC* (Intercellular adhesin, Cramton et al., 1999), y b) el gen *bap* (biofilm associate protein; Cucarella et al., 2004). De éstos, el operón *icaADBC* está presente en todas las cepas de *S. aureus* y en cepas patógenas de *S. epidermidis*, mientras que el gen *bap* ha sido descrito sólo en cepas de *S. aureus* causantes de mastitis en rumiantes. El gen *bap* forma parte de SaPIbov2, una nueva isla de patogenicidad descrita en *S. aureus*, la cual presenta una gran frecuencia de movilización (Úbeda et al., 2003).

Genes *ica*

Los genes *icaABCD*, presentes en *S. epidermidis* y *S. aureus* (Heilmann et al., 1996; Cramton et al., 1999) participan en el etapa de adhesión intercelular de la formación de biofilm mediante la codificación de proteínas implicadas en la síntesis del polisacárido poli-N-succinil b-1-6 glucosamina (polisacárido de adhesión intercelular, PIA) de la matriz del biofilm. La biosíntesis tanto de PIA como el PS/A (polisacárido capsular/adhesina) es codificado por el operón *ica*, que es compuesta por el gen *icaR* (gen regulador) y los genes *ica A,B,C* y *D*. Según un estudio de Vasudevan et al. (2003) la presencia de los genes *ica* en las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis, confirman el rol potencial como factor de virulencia en la patogénesis de la mastitis en rumiantes. Datos similares fueron reportados por un estudio de Melchior et al. (2006), en donde todas las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis fueron positivas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes *icaA* e *icaD*, demostrándose la asociación de estos genes con la formación del biofilm. La sola expresión de *icaA* induce una baja actividad enzimática, pero la coexpresión de *icaA* e *icaD* lleva a un incremento significativo en la actividad enzimática y se relaciona con la expresión fenotípica del polisacárido capsular (Cramton et al., 1999, Arciola et al., 2005). Cabe destacar que deleciones en el operón *ica* no impiden que la bacteria forme un biofilm, resaltando la existencia de una vía independiente del operón *ica*. En este mecanismo alternativo, *S. aureus* expresa una variedad de adhesinas que le permiten unirse y colonizar un gran número de superficies diferentes (O’Gara, 2001).

Proteínas de unión a fibronectina:

S. aureus posee diversas proteínas en su superficie, las cuales se denominan “moléculas adhesivas de matriz que reconocen componentes de superficie microbiana” (MSCRAMMs, por sus siglas en inglés) que median la adherencia a los tejidos del hospedero e inician la colonización, que podrá conducir al establecimiento de una infección (Gordon y Lowy, 2008). Ejemplo de ello son las proteínas A y B de unión a fibronectina (*FnbpA* y *FnbpB*), cuya función es favorecer la unión de la bacteria a los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina. La Fibronectina es una glicoproteína esencial multidominio, con múltiples propiedades adhesivas, que funcionan como un vínculo clave entre las células y su matriz extracelular. Generalmente se considera que funcionan como adhesinas bacterianas, se encuentran en los fluidos corporales, en las superficies de las células y en la matriz extracelular (O’Gara, 2001).

Proteína asociada a la formación de biofilm:

La proteína asociada a la formación de biofilm (*bap*) se ha encontrado principalmente en cepas aisladas de mastitis bovina y su expresión podría mejorar la adherencia intramamaria y formación biofilm (He et al., 2014). *Bap* es la primera proteína de la superficie de *S. aureus* directamente involucrada en la formación de biofilms en superficies abióticas (Valle et al., 2003; Otto, 2008). Su presencia en cepas de *S. aureus* responsables de mastitis subclínica sugiere que esta puede mejorar la adherencia y la formación de biofilms intramamarios lo que conduce a la ineficacia del tratamiento antibiótico contra las bacterias que en ellos se encuentran y la cronicidad de

la patología. Según un estudio realizado por Cucarella et al. (2004) aislamientos *bap* positivos fueron significativamente más capaces de colonizar y persistir en la glándula mamaria bovina *in vivo* y fueron menos susceptibles a tratamientos con antibióticos cuando formaron biofilms *in vitro* y el análisis estructural del gen *bap* reveló la existencia de formas alternativas de expresión de la proteína Bap en *S. aureus* aislados en condiciones de campo durante toda la vida del animal. Además, la interrupción del operón *ica* en una cepa *bap* positivo no tuvo efecto sobre en la formación de biofilms *in vitro*, un hallazgo que sugiere fuertemente que *bap* podría compensar la deficiencia en el producto de PIA / PSG (una matriz de polisacáridos biofilm).

Biofilm: Resistencia a los antimicrobianos

Dada la diversidad de agentes etiológicos causantes de mastitis, existe gran variedad de medidas de control; dentro de éstas la terapia antimicrobiana ha jugado un papel determinante en el control de la enfermedad, en especial en los casos en los cuales su aplicación es realizada en forma apropiada, al identificarse en primer lugar el agente etiológico y posteriormente conocer la sensibilidad del mismo a los antimicrobianos. El uso indiscriminado de los antimicrobianos ha hecho suponer que las bacterias presentes en la leche producida en el país, podrían alcanzar elevados porcentajes de resistencia frente a estos compuestos. En este sentido, la presencia de biofilm tiene un importante significado clínico, la experiencia clínica muestra que los mecanismos de defensa del huésped, así como las drogas antimicrobianas a las cuales las bacterias muestran ser sensibles *in vitro*, son incapaces de eliminar a los estafilococos del lugar *in vivo* (formando biofilms). Por lo tanto, se cree que la presencia de biofilm puede hacer que una célula bacteriana se torne de 10 a 1000 veces más resistentes a los efectos de los antimicrobianos (Mah y O'Toole, 2001). Las bacterias en biofilm presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped. Los biofilms, revestidos con exopolisacáridos y conteniendo múltiples microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune a las bacterias. Sumado esto a que, el biofilm provee de una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos a las defensas del huésped, como opsonización, lisis por complemento, y fagocitosis (Post et al., 2004).

La resistencia antibiótica en las cepas causantes de mastitis en rumiantes es a nivel mundial, un problema muy serio (Kumar et al., 2011). El nivel de uso y exposición de ciertos antibióticos para el tratamiento y control de la mastitis tanto en forma intramamaria como sistémica en un rodeo, se encuentra positivamente asociado a la resistencia antimicrobiana en los patógenos de la mastitis bovina en condiciones de campo (Saini et al., 2012). Entre las drogas usadas se observó que era más frecuente la aparición de resistencia a macrólidos y lincosamidas. Debido a que la dosificación significa claramente la selección a favor de la aparición de resistencia, es necesario tener especial cuidado y no establecer tratamientos con drogas de singular importancia para la salud humana como las fluoroquinolonas (Pol y Ruegg, 2007).

El monitoreo de la susceptibilidad antimicrobiana es una herramienta para estimar el comportamiento y la diversidad de las cepas autóctonas de *S. aureus*, aisladas de los

rodeos locales donde se emplea la antibioticoterapia, para implantar tratamientos efectivos (Rabello et al., 2005). Los aislamientos de *S. aureus* en distintos tambos muestran diferencias en los patrones de susceptibilidad antimicrobiana por lo que las evaluaciones deben ser realizadas en las diferentes regiones lecheras ya que estos patrones pueden variar por región (Ochoa-Zarzosa et al., 2007). Así mismo la relación entre los resultados obtenidos en la práctica clínica con respecto a los ensayos in vitro no siempre son coincidentes (Pol y Ruegg, 2005). En general se estima que los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de mastitis bovinas son altamente resistentes a los agentes antimicrobianos cuando crecen en biofilms (Melchior et al., 2006). Para algunos agentes antimicrobianos la concentración requerida para inactivar las bacterias en el biofilm pueden ser mil veces mayores a las requeridas para inactivar exactamente a las mismas cepas en forma planctónica. Así mismo concentraciones inhibitorias subliminales de antibióticos inducen en algunas cepas la formación de biofilm y promueven la autoagregación celular bacteriana de un patógeno importante como es *S. aureus* (Kaplan et al., 2012).

Para intentar explicar esta resistencia se han planteado diversas hipótesis las cuales describiremos a continuación. En primer lugar se sugiere una penetración lenta o incompleta del antibiótico en el biofilm lo cual se debería a que la matriz de exopolisacáridos constituye una barrera impidiendo este ingreso. Si bien estudios in vitro muestran que algunos antibióticos logran ingresar con cierta facilidad, debido a que no existiría una barrera genérica a su difusión a través de la matriz, se postula que si el antibiótico logra ser desactivado en ésta por acción de polímeros extracelulares, puede tener tan sólo una difusión limitada dentro del biofilm (Post et al., 2004).

En segundo lugar se describe la resistencia antimicrobiana debida a causas metabólicas, una baja actividad metabólica de las bacterias en biofilm por limitación de oxígeno y nutrientes puede causar que ingresen en un estado de lentificación o cese de su mitosis, especialmente aquéllas situadas más profundamente, con lo cual dejan de ser susceptibles a los antimicrobianos. Además, se ha descrito la formación de nichos anaeróbicos en zonas profundas de biofilms debido a consumo completo del oxígeno en las capas superficiales. Algunos antibióticos, como aminoglucósidos, son comprobadamente menos eficaces contra la misma bacteria en condiciones anaeróbicas que aeróbicas. Finalmente, una eventual acumulación de productos ácidos en el biofilm puede conducir a diferencias significativas de pH entre el exterior y el interior de éste, interfiriendo con la acción del antibiótico (Stewart, 2002; Post, 2004).

En tercer lugar se sugiere una resistencia asociada a cambios genéticos, se producirían modificaciones en la fisiología de las bacterias en biofilm y la aparición de genes específicos, producto de cambios genéticos, que potenciarían mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos. Según diversos investigadores, esta resistencia se debería principalmente a modificaciones fenotípicas en las bacterias en biofilm, las que serían de tipo protectoras, especialmente al generar cese de la mitosis (Scott y Manning, 2003; Chole y Faddis, 2003; Post et al., 2004; Sanclement et al., 2005; Thomas y Nakaishi, 2006). No obstante existir un respaldo mayoritario a esta hipótesis, Stewart y Costerton (2001) expresan sus dudas al respecto, señalando que cuando las

bacterias son dispersadas desde un biofilm, con frecuencia se tornan rápidamente susceptibles a antibióticos, lo que sugeriría que tal resistencia no sería adquirida vía mutaciones o elementos genéticamente movibles.

El éxito en el control de los biofilm en la industria láctea generalmente radica en un buen sistema de limpieza “Clean In Place” (CIP) (Flint et al., 1997). Ha sido demostrado que la forma de limpieza y sanitización habituales no son suficientes para disminuir el número de células viables adheridas al biofilm. Las células bacterianas adheridas al equipamiento incrementan su resistencia a los desinfectantes y a la vez se convierten en fuente de contaminación (Simões et al., 2010, Öner y Ölmez, 2011). Diversas cepas aisladas de biofilms generados en plantas de industrias lácteas donde se estudió la susceptibilidad antibiótica de las mismas, exhibieron una amplia resistencia a los compuestos antimicrobianos (carbenicillina, cloxacillina, cephaloridina, novobiocina y vancomicina), indicando la presencia de una microbiota multirresistente que en el caso de las plantas pueden llegar a contaminar el producto final (Sharma y Anand, 2002).

En este sentido, la habilidad de producir biofilm, hace a este patógeno resistente a diferentes agentes antibacterianos y la matriz lo hace insensible a las moléculas antibacterianas y a las células movilizadas por el huésped (Costerton et al., 1999; Melchior et al., 2006).

Implicancia del biofilm en la industria

Los mecanismos subyacentes en la formación de biofilm bacterianos y su comportamiento aún deben comprenderse y son objeto de nuevas estrategias para lograr controlar problemas causados en particular en los ambientes en donde se procesan alimentos. El deterioro de los alimentos da como resultado no sólo pérdidas económicas, sino problemas en inocuidad alimentaria. El biofilm formado tiene especial importancia debido a su potencial como fuente permanente de contaminación microbiana que puede llevar al deterioro del alimento y la transmisión de enfermedades. La adhesión bacteriana a las superficies es en general un proceso rápido, y frecuentemente la limpieza y/o desinfección no son suficientes para evitarlo, no obstante se puede estudiar la frecuencia de uso de desinfectante que permita inhibir la maduración del biofilm (fase irreversible) siempre y cuando el tipo de agente y la dosis sean los indicados. La remoción incompleta del material favorece la re-adhesión aun si las células bacterianas que formaban el biofilm fueron inactivadas (Van Houdt y Michiels, 2010).

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de adherencia y formación de biofilms por *S. aureus* provenientes de leche cruda de vacas con mastitis subclínica así como sus características topomorfológicas y de susceptibilidad antibiótica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los atributos de adherencia: hidrofobicidad de la superficie bacteriana, autoagregación y producción de limo.
- Determinar desde el punto de vista molecular la presencia de algunos genes asociados a la formación de biofilm.
- Determinar la capacidad de formación de biofilm de los aislamientos en distintos medios de cultivo, estudiando las características topo-morfológicas del biofilm desarrollado mediante microscopia confocal.
- Evaluar la susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas, determinar las concentraciones inhibitoria mínima y bactericida mínima, de antimicrobianos utilizados con mayor frecuencia en la clínica.
- Evaluar la susceptibilidad antibiótica de las células en el biofilm desarrollado en diferentes medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Se utilizaron 3 aislamientos de *S. aureus* provenientes de leche de vacas en ordeño, con mastitis subclínica, de dos tambos situados en la cuenca lechera de nuestro país, obtenidos en muestreos mensuales a lo largo de un año. Los aislamientos se identificaron en base a tests apropiados de acuerdo con el “standard cultured methods” usando métodos fenotípicos en el siguiente orden: cocos positivos a la coloración de Gram, que evidenciaron actividad de las enzimas catalasa y coagulasa. Para la diferenciación entre *S. aureus* y otros estafilococos con presencia de enzima coagulasa se usó el test de Voges-Proskauer (Chanchaithong y Prapasarakul, 2011). Además, se llevaron a cabo algunas pruebas adicionales como fermentación de manitol, hemólisis y actividad DNAsa. Debido a que la asociación de dos o tres de estos tests mostraron, en diferentes estudios, valores predictivos positivos satisfactorios para identificar *S. aureus* provenientes de mastitis bovina. (Tarabla, 2000; Boerlin et al., 2003; Kateete et al., 2010). También se llevó a cabo un test de clustering usando el index de similitud de Ochiai a fin de mejorar el nivel de confianza en la selección de las cepas (Hammer et al., 2001).

Utilizando 20 aislamientos originales (de los Santos et al., 2013) se determinó la cinética de la formación de biofilm sobre poliestireno. Se estudió la evolución del biofilm en el tiempo, según el método descrito por de los Santos et al. (2013). Los aislamientos evidenciaron diferentes patrones cinéticos durante el tiempo establecido, en el que muestran uno o más ciclos de adherencia y desprendimiento en el período ensayado. En base a estos resultados se seleccionaron 3 cepas de grupos con comportamientos diferentes, codificadas como: 090333, 090108 y 090317. Además, fueron usadas como cepas de referencia las cepas *S. aureus American Type Culture Collection* (ATCC) 29213 (Boerlin et al., 2003), ATCC 25923 (Kateete et al., 2010) y ATCC 6538 (O’Reilly et al., 2000).

Estudios preliminares: medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de estos microorganismos fueron: Caldo Trypticasa de Soya (TSB, HiMedia®, India), TSB más glucosa al 1% (Dextrosa DIFCO Laboratories, USA), TSB más Lactosa al 1% (Merck, Alemania), Caldo Cerebro Corazón (BHI, HiMedia®, India) más glucosa al 1% y Leche UHT Descremada (Conaprole, Uruguay), para la siembra en placa se utilizó Agar Trypticasa de Soya (TSA, HiMedia®, India). Para los ensayos de formación de biofilm se utilizaron placas de fondo plano de 96 pocillos (Thermo Fischer Scientific, Dinamarca). La re-suspensión de las cepas y los diferentes lavados se realizaron con una solución buffer fosfato estéril (PBS, 10mM, pH 7). Todas las cepas fueron mantenidas congeladas a -20°C en TSB, (HiMedia®, India) suplementado con glicerol (20%, v/v).

Descongelado de las cepas

Las cepas congeladas se sembraron en tubos con 5 mL de BHI (Himedia®, India) se incubaron a 37°C por 24 hs en aerobiosis, posteriormente se sembraron por estrías en placas de TSA, (HiMedia®, India) y se incubaron a 37°C durante 24 hs en aerobiosis. La pureza de las mismas se confirmó mediante el examen macroscópico de las colonias, tinción de Gram y prueba de catalasa.

Atributos de adherencia

La hidrofobicidad (H), autoagregación y formación de limo son características importantes en la colonización y desarrollo del biofilm (Rickard et al., 2004; Nazar, 2007).

Hidrofobicidad

El porcentaje de hidrofobicidad (H%) de la superficie bacteriana de los distintos aislamientos se determinó de acuerdo al protocolo de partición de xileno descrito por Biblioni et al. (2001). El mismo consistió en medir la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de un cultivo problema antes y después de realizar un tratamiento con xilol y hacer el cálculo de la variable siguiendo la fórmula:

$$H\% = \left[\left(A_0 - \frac{A}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Se inocularon 200 μ L de suspensión bacteriana ajustada al 0,5 Mc Farland en 1800 μ L de los diferentes medios de cultivo (TSB con glucosa y con leche UHT descremada) y se incubaron a 37°C durante 48 hs en aerobiosis. Luego se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm y resuspendieron en 1 mL solución buffer fosfato (PBS), ajustando las suspensiones bacterianas a una DO_{600} de 0.8. Posteriormente, 1 mL de cada una de estas suspensiones bacterianas fue adicionada con 200 μ L de xilol y se agitó en vórtex durante 2 min (Quimis®, Brasil). Los tubos fueron incubados por 20 min a T ambiente para lograr la separación de las fases hidrófila e hidrófoba. Luego de transcurrido el período de incubación, se retiró el xilol y se midió la DO_{600} de la fase hidrófila (acuosa). La disminución de la turbidez de esta fase se consideró como una medida de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, que se calculó según la fórmula antes citada, donde A_0 y A corresponden a la DO_{600} que se midió previamente y después de la extracción del hidrocarburo respectivamente. La superficie bacteriana de las cepas se consideraron fuertemente hidrofóbicas cuando $H > 50\%$, moderadamente hidrofóbicas cuando $20\% < H < 50\%$ e hidrofílicas cuando los valores fueron $H < 20\%$ (Mattos-Guaraldi et al., 1999). Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* (ATCC: 6538, 29213 Y 25923) y el medio sin inocular se utilizó como blanco. Se realizaron tres ensayos de forma independiente.

Los datos fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis para establecer si había diferencias significativas ($p < 0,05$), seguido del test de Mann-Whitney para establecer entre qué cepas se encontraron las mismas.

Autoagregación

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo propuesto por Arrizubieta et al. (2004) con modificaciones. A partir de cultivos bacterianos frescos (24 hs) en TSA (HiMedia®, India), se obtuvieron suspensiones bacterianas ajustando la turbidez a 0,5 según escala Mac Farland (Aproximadamente 10^8 UFC/mL) en una solución estéril de cloruro de sodio al 0.85%. Posteriormente se inocularon 500 μ L de dichas suspensiones en 5 mL de TSB glucosa al 1% y se incubó a 37°C durante 18 hs en aerobiosis. A partir de estos cultivos se realizó una dilución 1/1000 en caldo TSB (HiMedia®, India) glucosa al 1% con el fin de estandarizar el inóculo. Estas suspensiones fueron incubadas a 37°C por 48 hs y luego permanecieron 24 hs más a 4°C. De la superficie de cada tubo se extrajeron 2 mL para transferirlos a cubetas estériles donde se midió la DO_{600} final por espectrofotometría (UNICO® 1100/1100RS). Posteriormente los tubos fueron agitados vigorosamente durante 30 segundos volviendo a extraer 2 mL de cada uno para transferirlos nuevamente a cubetas estériles y medir la DO_{600} inicial. El porcentaje de autoagregación se calculó como (Sorroche et al., 2010):

$$\% A = 100 \left[1 - \left(\frac{OD_{final}}{OD_{inicial}} \right) \right]$$

Como controles se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* (ATCC: 6538, 29213 Y 25923) y el medio sin inocular se utilizó como blanco. Se realizaron tres ensayos de forma independiente.

Dadas las características de los datos estudiados, se procedió a analizarlos mediante el test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), seguido del test de Mann-Whitney como test *a posteriori*.

Producción de Limo

Para determinar la producción de limo se empleó la técnica desarrollada por Freeman et al. (1989) utilizando agar Rojo Congo (CRA), (Baselga et al., 1993; Türkyilmaz y Kaya, 2006). La composición del medio en gramos por litro fue: Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, Himedia®, INDIA) 37 g/L, Sucrosa 50 g/L, agar 10 g/L y Rojo Congo 0.8 g/L. Las placas se sembraron y se incubaron a 37°C, por 24 hs en aerobiosis. Los aislamientos que al crecer, produjeron colonias negras de consistencia seca y cristalina, se consideraron productores de limo y los que dieron origen a colonias de color rosado, no productores. Como control negativo se empleó una cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Determinación de genes asociados a la capacidad de formación de biofilm

La presencia de los genes *IcaD* (adhesina intercelular), *fnbpA* (proteínas de unión a la fibronectina) y *bap* (proteínas asociadas al biofilm) se analizó mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de acuerdo al protocolo descrito por Vasudevan et al. (2003), con modificaciones.

Extracción de ADN

Para la realización de las pruebas moleculares se procedió en primer lugar a la extracción del ADN de las bacterias luego de la incubación a 37°C durante 24 hs en caldo BHI (HiMedia®, India). Para ello se utilizó el kit de extracción (GenElute™ Bacterial Genomic DNA, Sigma-Aldrich). El cual consistió en:

- Centrifugar 1,5 mL del cultivo a 13000 xg durante 2 minutos, descartando el medio.
- Resuspender el pellet en 200 µL de una suspensión de lisozima a 37°C durante 30 minutos (digestión de la pared celular).
- Adicionar 20 µL de proteinasa K y 200 µL de la solución de lisis a la suspensión celular. Vortexear la mezcla e incubar a 55°C por 10 minutos (Lisis celular).
- Agregar 500 µL de la solución de preparación de la columna a cada columna y centrifugar (Eppendorf®, Mini Spin) a 12000 xg durante 1 minuto (preparación de la columna).
- Agregar 200 µL de etanol a la células lisadas y vortexear, la mezcla se transfiere a la columna y se centrifuga a 6500 xg por 1 minuto (unión de ADN a la columna)
- Adicionar 500 µL de solución de lavado de la columna y centrifugar nuevamente a 6500 xg durante 1 minuto (columna de lavado)
- Realizar nuevamente el lavado de la columna con 500 µL de una solución de lavado concentrada, y centrifugar a 12000 xg por 3 minutos (repetición del lavado de la columna)
- Transferir la columna a un nuevo tubo agregándole 200 µL de agua bidestilada y centrifugar a 6500 xg durante 1 minuto.

El ADN extraído fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop® y por electroforesis en gel de agarosa (0,8%) frente a un marcador de concentración (Gen Ruler™ 1kb plus, 75-20000 pb).

Selección de primers

Los primers que se emplearon para la amplificación, la secuencia y su referencia se muestran en el cuadro I.

Cuadro I. Primers utilizados para la detección de genes asociados a la formación de biofilm.

Primers	Sec. oligonucleótidos	Referencia
<i>IcaD</i>	F: ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG R: CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	Chaieb et al ., 2005
<i>fnbpA</i>	F: AAG AAG AGG TAG TTA AGG AAG R: CCA TAG CTG ATG AAT CCG TTT TC	Zhang et al., 2010
<i>Bap</i>	F: CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC R: GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC	Veeresh et al., 2012

F: forward; R: reverse

Diseño de la técnica de PCR

La técnica de PCR se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Vasudevan et al. (2003), con algunas modificaciones según el proveedor del kit utilizado (Platinum® *Taq* DNA Polymerase). Para la amplificación se preparó una mezcla de 25 µL cuyos componentes se detallan en el cuadro II.

Cuadro II. Componentes de la mezcla final empleada.

Material	Concentracion Final	25 μL
Sol. Buffer (10X)	1X	2,5 μ L
dNTPs (10mM mix)	0,2 mM c/u	0,5 μ L
MgCl₂ (50mM)	1,5 mM	0,75 μ L
Forward primer	0,2 mM	0,5 μ L
Reverse primer	0,2 mM	0,5 μ L
Taq polimerasa	2 U	0,1 μ L
ADN molde	<500ng	1 μ L
Agua Milli Q	-	19,15 μ L

Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador (LabNet®, Multigene, EUA). Se realizaron 30 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización: 92°C durante 45 segundos
- Cebado/anillamiento : 49°C durante 45 segundos
- Elongación: 72°C durante 1 minuto
- Extensión final: 72°C durante 7 minutos

La presencia y el tamaño de los productos amplificados se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y su posterior tinción con GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain), visualización y registro fotográfico empleando transiluminador y software para adquisición de imágenes (Kodak, EUA).

Para el estudio de los genes asociados a la formación de biofilm por la técnica de PCR se emplearon además de las cepas ya citadas, las cepas 080611 y 090305.

Producción de biofilm en diferentes medios de cultivo

Se determinó, en forma indirecta, la producción de biofilm en 3 medios de cultivo diferentes según el método desarrollado por Stepanovic et al. (2007). Los medios empleados fueron: leche descremada UHT, TSB (HiMedia®, India) suplementado con glucosa al 1% y TSB (HiMedia®, India) suplementado con lactosa al 1%. A su vez se consideraron 2 tiempos de incubación: 12 hs (tiempo transcurrido entre cada ordeño, con el fin de igualar las condiciones *in vivo*) y 24 hs (ciclo de formación de biofilm, estudiado previamente). Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado.

El método empleado consistió en: utilizando una microplaca de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos, se colocaron en cada pocillo 20 μL de suspensión bacteriana (ajustada a 0,5 según escala Mc. Farland en diluyente estéril, 0.85% de NaCl) con 180 μL de los medios respectivos. Las placas se incubaron a 37°C, durante el periodo correspondiente a cada ensayo. A continuación se realizaron tres lavados con 200 μL de PBS estéril (10 mmol, pH 7,0) a fin de remover las células no adheridas a la superficie de la placa. Posteriormente el biofilm adherido a cada pocillo se fijó con 200 μL de metanol durante 20 minutos. Después de esto las placas se invirtieron para descartar el excedente y se secó a temperatura ambiente durante 20 minutos más. Para colorear las células bacterianas adheridas a la placa se agregaron 200 μL de cristal violeta al 0,5% durante 15 minutos. Las placas se lavaron luego con agua corriente y posteriormente se secaron a temperatura ambiente. El colorante adherido al biofilm se solubilizó con 200 μL de etanol 96° durante 30 minutos. La absorbancia se midió con un lector de ELISA (Labsystem Multiscan MS) a una longitud de onda de 450 nm. Como blanco se utilizaron los medios sin inocular. Los valores medios de DO_{450} se calcularon para todas las cepas ensayadas y controles negativos.

Interpretación de resultados: Los valores medios de DO se calcularon para todas las cepas ensayadas y controles negativos, ya que todas las pruebas se realizan por triplicado. En segundo lugar, el valor de corte (VC) se estableció, definiéndolo como tres desviaciones estándar (σ) por encima de la DO del control negativo, $[B+3(\sigma)]$ donde “B” es la media de los blancos y “ σ ” el desvío estándar de las lecturas de los blancos (Stepanovic et al., 2007). Según estos resultados las cepas se clasificaron en fuertes, moderadas, débiles y no productoras de biofilm (Figura 2).

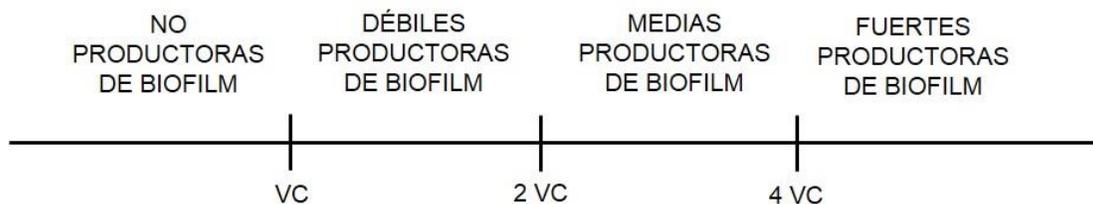


Figura 2. Clasificación de las cepas según su DO (Stepanovic et al., 2007). Valor de corte (VC).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza factorial considerando como factores las cepas y los medios de cultivo y su interacción con la variable DO.

El desarrollo del biofilm de cada cepa y en cada medio a las 12 y a las 24 hs se estudió mediante test de Student ($p < 0,05$).

Caracterización de la formación del biofilm en el tiempo

La caracterización de la formación de biofilm en el tiempo se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Schlapp et al. (2011), utilizando la cepa identificada como 090333 y en dos tiempos 24 y 48 hs. Para ello la cepa fue inoculada en tubos tipo Falcon conteniendo 30 mL de leche descremada UHT y un cubreobjetos estéril. El inóculo se ajustó al 0,5 de la escala Mc Farland, luego se realizó una dilución 1/10 en leche descremada UHT, y finalmente se inoculó con 3 mL cada tubo, de manera de obtener una concentración final aproximada de 1×10^6 UFC/mL. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 o 48 hs.

La estructura tridimensional del biofilm se analizó mediante tinción con marcadores fluorescentes y su posterior visualización al microscopio confocal (Olympus fv300). Para esto los distintos cubreobjetos correspondientes a cada tiempo fueron marcados empleando la tinción para bacterias vivas y muertas (FilmTracer TM LIVE/DEADF Biofilm viability kit, Molecular Probes) y para matriz extracelular (FilmTracer TM SYPRO (R) Ruby Biofilm Matrix Stain). Las bacterias se visualizaron al microscopio confocal y se adquirieron los distintos set de imágenes en los planos xyz. Este ensayo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay).

Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas

La susceptibilidad de los aislamientos a los diferentes antibióticos se realizó mediante el uso de la técnica de difusión de disco de Kirby-Bauer y de acuerdo a las directrices de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Bauer et al., 1966; CLSI, 2012). Los inóculos se prepararon mediante la suspensión de los aislamientos en solución salina 0,85% y ajustándolos hasta alcanzar una turbidez aproximada de 0,5 Mc Farland, ésta suspensión se utilizó para hisopar de forma homogénea la superficie de placas con agar Müeller Hinton (MHA, HiMedia®, India). Posteriormente, se dejaron secar 10 a 15 minutos y se colocaron los discos impregnados de los diferentes antibióticos a concentraciones ya estandarizadas. Los antibióticos utilizados en este ensayo fueron: Penicilina 10 UI, Estreptomina 10 µg, Gentamicina 10µg, Sulfadimetoxina 23,75µg con Trimetoprima 1,25µg, Neomicina, Cefazolina 30µg, Clindamicina 2µg. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas aeróbicamente. Como cepa control se utilizó Escherichia coli ATCC 25922. La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición y los resultados se interpretaron de acuerdo con los criterios establecidos por CLSI (2012). El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y mínima bactericida (CBM) en células planctónicas

La determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida en células planctónicas se llevó a cabo en base al método de dilución para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias que crecen en forma aeróbica, establecido por Ferraro (2000) con modificaciones.

En el método de microdilución se usó la placa de la siguiente manera: cada columna correspondió a una cepa y cada fila correspondió a una dilución decreciente del mismo antibiótico (los antibióticos utilizados y sus concentraciones se muestran en el Cuadro III). Por cada microorganismo y para cada antimicrobiano se utilizaron dos filas de pocillos (duplicado). Para la preparación de los antibióticos y sus diluciones se colocaron en el primer pocillo 200 μ L de solución de antibiótico concentrada a partir de la cual se procedió a realizar la serie de diluciones en los pocillos sucesivos que ya contenían 100 μ l de caldo Müeller Hinton (MH, HiMedia®, India). El último pocillo de cada fila no fue inoculado con antibiótico y se utilizó como control. Una vez obtenidas las diluciones, se inoculó con cada cepa. Para ello se preparó un inóculo bacteriano ajustando la turbidez a 0.5 de MacFarland y diluyendo luego a 1:100 (aproximadamente 10^6 UFC/mL) en el mismo caldo. Se añadió a cada pocillo 100 μ L del inóculo ajustado. Las placas se incubaron a 37°C durante 20 hs. El ensayo se llevó a cabo por duplicado. La CIM se determinó como la mínima concentración de antibiótico que fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano luego de la incubación (última dilución del antibiótico que no presentó turbidez). Para la determinación de la CBM luego de la incubación, los pocillos que no presentaron turbidez fueron sembrados en placas con Agar TSA (HiMedia®, India), se sembraron 3 alícuotas de 20 μ L por cada dilución y en duplicado y posteriormente se incubó a 37° C por 24 hs. La CBM se definió como la mínima concentración de antibiótico que fue capaz de inducir la muerte in vitro del 99,9% de las bacterias en el tiempo predeterminado (no se observaron colonias en las placas luego de la incubación).

Cuadro III. Concentraciones de antibiótico utilizadas para los ensayos de CMI y CBM de los aislamientos en estudio (Factor de dilución 0,5).

<i>P0</i> (µg/mL)	<i>E10</i> (µg/mL)	<i>GEN10</i> (µg/mL)	<i>Sulfa</i> (µg/mL)	<i>TMP</i> (µg/mL)
6250	7812,5	1250	5836,9	1250
3125	3906,3	625	2918,4	625
1562,50	1953,13	312,50	1459,22	312,50
781,25	976,56	156,25	729,61	156,25
390,63	488,28	78,13	364,80	78,13
195,31	244,14	39,06	182,40	39,06
97,66	122,07	19,53	91,20	19,53
48,83	61,04	9,77	45,60	9,77
24,41	30,52	4,88	22,80	4,88
12,21	15,26	2,44	11,40	2,44
6,10	7,63	1,22	5,70	1,22
3,05	3,81	0,61	2,85	0,61
1,53	1,91	0,31	1,43	0,31
0,76	0,95	0,15	0,71	0,15
0,38	0,48	0,08	0,36	0,08
0,19	0,24	0,04	0,18	0,04
0,10	0,12	0,02	0,09	0,02

E10: Estreptomycin; P0: Penicilina; GEN10: Gentamicina; TMP: Trimetoprim; Sulfa: Sulfadimetoxina.

Concentración inhibitoria mínima y concentración mínima de erradicación de Biofilm en BHI y leche UHT descremada

Para la determinación de las concentraciones inhibitoria mínima y erradicatoria mínima de biofilm se utilizó el método descrito por Melchior (2011) modificado, utilizando placas de 96 pocillos. Para la determinación de la CMI se procedió de la siguiente manera:

- 1- Una suspensión bacteriana de cada cepa fue ajustada al 0,5 Mc Farland, realizando posteriormente diluciones seriadas en BHI (Himedia®, India) o leche descremada UHT, de manera de obtener una concentración aproximada de 1×10^6 UFC/mL.
- 2- Se inoculó cada pocillo con 200 µL de dicha suspensión, menos uno que se utilizó como control negativo (medio: BHI / Leche, sin inóculo). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 hs sin agitación.
- 3- El contenido de la placa fue descartado y se realizaron dos lavados de los pocillos con PBS estéril. El tratamiento control de cada cepa (sin antibiótico) fue fijado y coloreado de acuerdo a lo descrito anteriormente para la formación de biofilm (Stepanovic et al., 2007). La DO fue leída a 450nm utilizando un lector de ELISA (Labsystem Multiscan MS).

- 4- El resto de los pocillos de los diferentes tratamientos se inocularon con 200 μ L de las diluciones seriadas (base 2) de los antimicrobianos en estudio (Penicilina/Estreptomina, Gentamicina o Sulfadimetoxina/Trimetroprima). Las placas se incubaron a 37°C durante otras 24 hs, sin agitación.
- 5- Luego de la incubación se realizaron dos lavados con PBS estéril y se procedió a la fijación, coloración y lectura de acuerdo a lo anteriormente descrito.

La mínima concentración inhibitoria del biofilm se definió como la dilución más baja del antimicrobiano sin crecimiento visible y en la cual no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al blanco (Melchior et al., 2011).

Para la determinación de la CMEB se procedió de igual manera que en los pasos 1 a 4 de la CIMB, luego de ello se realizaron dos lavados con PBS esteril y se procedió a reponer cada pocillo con el medio utilizado (leche UHT o BHI + glucosa). Posteriormente las placas fueron sonicadas (ULTRASONIC CLEANER YJ5120-1) durante 5 minutos y se incubaron a 37°C durante 24 hs en aerobiosis. Luego de este periodo nuevamente se realizaron dos lavados con PBS estéril y se procedió a la fijación, coloración y lectura de acuerdo a lo anteriormente descrito.

La mínima concentración de erradicación de biofilm se definió como la mínima concentración del antimicrobiano en la cual no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al blanco (no hay crecimiento visible luego de la reposición del medio de cultivo) (Melchior et al., 2011).

Las concentraciones de antimicrobianos utilizadas en ambos ensayos se muestran en el Cuadro III. El ensayo fue realizado por duplicado y en dos experimentos independientes. Se realizó un análisis exploratorio de datos.

RESULTADOS

Hidrofobicidad

Los resultados de los valores de la media del porcentaje de hidrofobicidad de las cepas en estudio, así como el análisis estadístico se indican en el Cuadro IV.

En este trabajo las cepas fueron clasificadas de acuerdo a su % de hidrofobicidad según el criterio propuesto por Mattos-Guaraldi et al. (1999) en: fuertemente hidrofóbicas ($H > 50\%$), moderadamente hidrofóbicas ($20\% < H < 50\%$) e hidrofílicas ($< 20\%$). En medio TSB con glucosa al 1% todas las cepas fueron clasificadas como fuertemente hidrofóbicas a excepción de la cepa ATCC 29213, que se consideró moderadamente Hidrofóbica. En los ensayos realizados en Leche UHT todas las cepas resultaron fuertemente hidrofóbicas.

Cuadro IV. Porcentaje de hidrofobicidad de los aislamientos de *S. aureus* asociados a Mastitis Sub Clínica (MSC) en diferentes medios de cultivo.

Cepa	%H TSB+Glucosa*	%H Leche UHT*
90333	66 ± 0,021	52 ± 0,001
90108	51 ± 0,069	55 ± 0,030
90317	56 ± 0,087	62 ± 0,075
ATCC 6538	58 ± 0,051	51 ± 0,083
ATCC 29213	36 ± 0,074	66 ± 0,054
ATCC 25923	51 ± 0,023	53 ± 0,076

**Media de los porcentajes de hidrofobicidad.*

Autoagregación

Los resultados de la mediana de los porcentajes de autoagregación de las cepas evaluadas y su análisis estadístico se muestran en el cuadro V.

Cuadro V. Porcentaje de autoagregación en los aislamientos de *S. aureus* asociados a MSC en TSB glucosa al 1%.

Cepa	%Autoagregación*
090333	83,8 ^b (82,9 - 92,3)
090108	95,7 ^c (93,7 - 98,4)
090317	77,3 ^a (56,8 - 77,4)
ATCC 6538	98,1 ^c (98,0 - 100)
ATCC 29213	88,5 ^b (84,4 - 91,0)
ATCC 25923	97,0 ^c (95,3 - 98,1)

*Mediana de los porcentajes de autoagregación. Valores con diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las mismas. ($p < 0.05$). Los valores entre paréntesis corresponden a mínimos y máximos de los %A para cada cepa.

Formación de limo

Todas las cepas en estudio produjeron limo al ser cultivadas en Agar Rojo Congo. Esto se constató al observarse colonias negras de consistencia seca y cristalina, característica que exhiben las cepas productoras de limo cuando crecen en este medio (Figura 3). Las cepas de referencia de *S. aureus* utilizadas como controles positivos exhibieron estas características. En contraste, el control negativo utilizado para este ensayo, la cepa de *E. coli* ATCC 25922, exhibió un color rosado característico de cepas no productoras de limo.

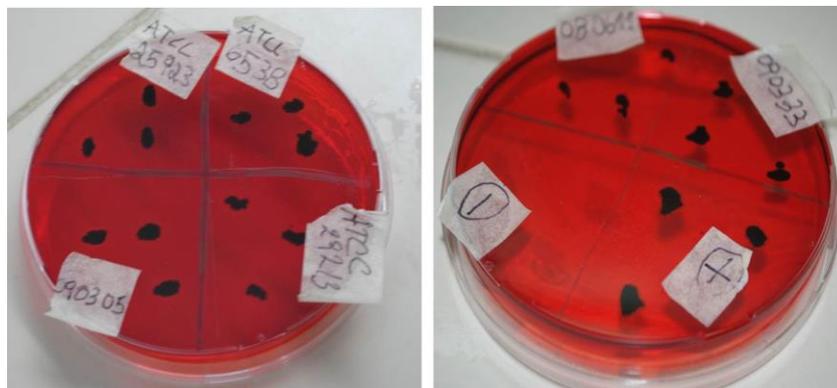


Figura 3. Producción de limo en Agar Rojo Congo aislamientos de *S. aureus* asociados a MSC. Cepas productoras: colonias negras de consistencia seca y cristalina. Cepas no productoras color rosado

Determinación de genes asociados a la capacidad de formación de biofilm

La presencia de los genes *IcaD*, *fnbpA* y *bap* se analizó mediante amplificación por PCR. Todos los aislamientos fueron positivos para la presencia del gen *fnbpA*, ninguno presento gen *IcaD* y los aislamientos codificados como 090333 y 090317 fueron positivos para el gen *bap* (Figura 4).

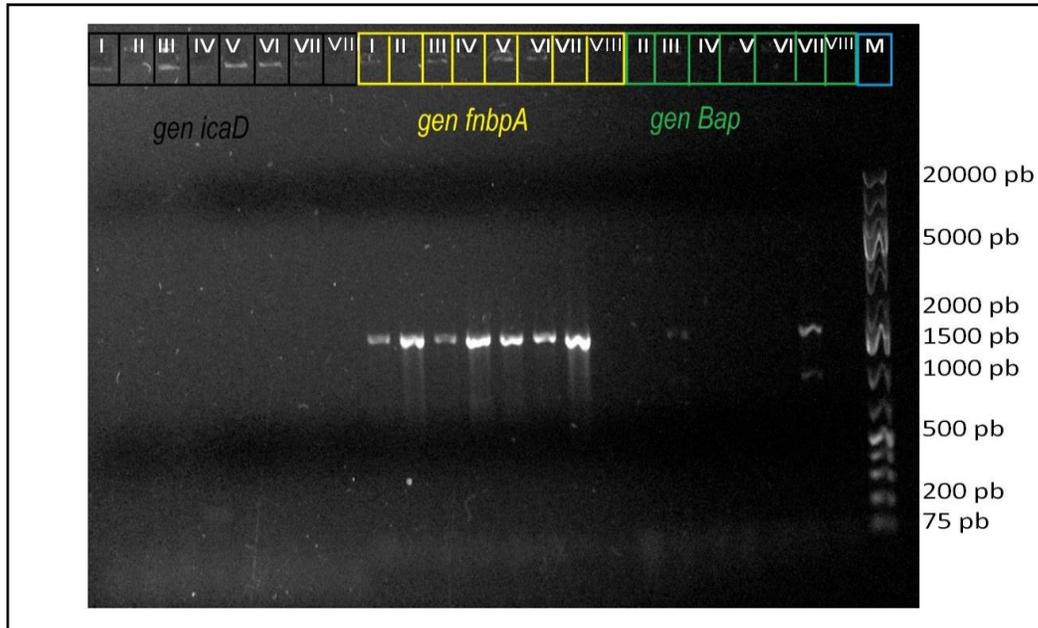


Figura 4. Resultados de PCR para los genes *IcaD* (187 pb), *FnbpA* (1417 pb) y *Bap* (903pb) de los aislamientos de mastitis subclínica. Carriles: (I) 090333, (II) 090108, (III) 090317, (IV) 080611, (V) 090305, (VI) ATCC 6538, (VII) 090333, (VIII) Control -, (M) Marcador (Gen Ruler TM 1kb plus, 75-20000 pb)

Formación de Biofilm en diferentes medios de cultivo

Los resultados obtenidos en este estudio se analizaron, interpretaron y clasificaron de acuerdo al protocolo descrito Stepanovic et al. (2007) y se indican en los cuadros VII y VIII. En función de los resultados obtenidos se realizó un análisis exploratorio de los datos, a fin de determinar el efecto tiempo, cepa y medio utilizados en ellos. Al realizar el análisis estadístico de la variable DO asociada al medio de cultivo, la cepa y el tiempo así como la interacción del medio de cultivo y la cepa, podemos decir que todos los efectos son significativos y también su interacción (cuadro VI).

Cuadro VI. Análisis de varianza: resultados de la variable DO asociada a medio de cultivo, cepa y tiempo y la interacción medio de cultivo tiempo.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F calculado	P
Efectos	0.008703674	18	0.000483537	17.53	<0.0001
Medio	0.005498137	2	0.002749068	99.68	<0.0001
Cepa	0.000679309	5	0.000135862	4.93	0.0003
Medio*Cepa	0.000895642	10	0.000089564	3.25	0.0008
Tiempo	0.000112007	1	0.000112007	4.06	0.0455
Residual	0.004440076	161	0.000027578		
Total	0.01314375	179	0.000073429		

**Interacción medio de cultivo-cepa*

Cuadro VII. Formación de biofilm en 12 horas y su clasificación según lo propuesto por Stepanovic et al. (2007)

Cepa	TSB + Gluc. 1%*	TSB + Lact. 1%*
90333	0,047 ± 0,002	0,045 ± 0,001
90108	0,050 ± 0,001	0,050 ± 0,003
90317	0,048 ± 0,002	0,050 ± 0,003
ATCC 6538	0,050 ± 0,002	0,045± 0,001
ATCC 29213	0,045 ± 0,002	0,045 ± 0,001
ATCC 25923	0,048 ± 0,003	0,048 ± 0,002

**DO₄₅₀ valores medios ± desvío estándar. Nota: todas las cepas resultaron débiles formadoras de biofilm (la densidad óptica resulto menor a 2xVC; VC: TSB+gluc. 1%= 0,0431; TSB lact. 1%= 0,0492)*

Cuadro VIII. Formación de biofilm en 24 horas y su clasificación según lo propuesto por Stepanovic et al. (2007).

Cepa	TSB + Gluc. 1%*	TSB + Lact. 1%*	Leche UHT*
90333	0,055 ± 0,001	0,045 ± 0,001 [#]	0,062 ± 0,004
90108	0,052 ± 0,004	0,045 ± 0,003 [#]	0,063 ± 0,008
90317	0,060 ± 0,007	0,044 ± 0,003 [#]	0,072 ± 0,007
ATCC 6538	0,050 ± 0,006	0,044 ± 0,004 [#]	0,065 ± 0,003
ATCC 29213	0,050 ± 0,006	0,047 ± 0,005 [#]	0,067 ± 0,005
ATCC 25923	0,049 ± 0,003	0,051 ± 0,001	0,055 ± 0,003

* DO_{450} valores medios \pm desvío estándar. Nota: todas las cepas resultaron débiles formadoras de biofilm (la densidad óptica resultó menor a $2 \times VC$; VC: TSB+gluc. 1%= 0,0439; TSB lact. 1%= 0,0492; Leche UHT= 0,0410), a excepción de las cepas identificadas con # que resultaron no productoras de biofilm ($< VC$).

Caracterización de la formación del biofilm en el tiempo

La caracterización de la formación de biofilm de la cepa 090333 en leche descremada UHT a las 24 y 48 hs se muestra en la Figura 4.

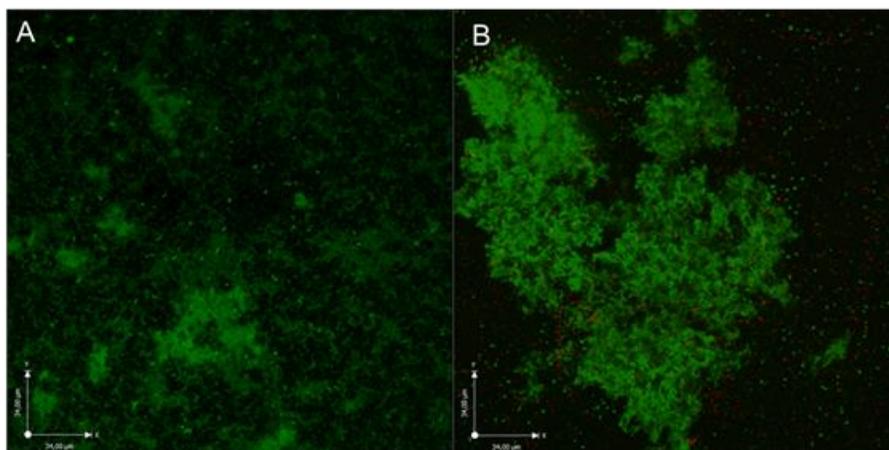


Figura 5. Imágenes de la producción de biofilm de la cepa 090333 en leche descremada UHT (microscopia confocal de fluorescencia). Producción de biofilm en el tiempo A: 24 horas de incubación, B: 48 horas de incubación. Tinción de bacterias vivas/muertas: color verde= vivas, color rojo=muertas.

Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas

Los resultados obtenidos en la determinación de la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus* según el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición (Figura 5) y los resultados se interpretaron según las normas de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997; Gandara et al., 2006) clasificándose en sensibles, intermedias o resistentes (Cuadro IX).

Cuadro IX. Resultados de la determinación de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos de *S. aureus* asociados a MSC.

Cepa	COT25	GEN10	N30	P0	CH30	E10	CD2	CIP5
090333	S	S	S	R	S	S	S	S
090108	S	S	S	S	S	S	S	S
090317	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC 6835	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC29213	S	S	S	R	S	S	S	S
ATCC25923	S	S	S	S	S	S	S	S

S: cepa sensible. R: cepa resistente.

COT25: Trimetoprim, 1,25 µg – Sulfadimetoxina, 23,75 µg (Resistente ≤10 mm; Intermedio: 11-15 mm; Sensible ≥16 mm); **GEN10:** Gentamicina (Resistente ≤12 mm; Intermedio: 13-14 mm; Sensible ≥15 mm); **N30:** Neomicina (Resistente <13 mm; Intermedio: 13-16 mm; Sensible >17 mm); **P10:** Penicilin, 10 U (Resistente ≤28 mm; Sensible ≥29 mm); **CH30:** Cefazolina, 30 µg (Resistente ≤14 mm; Intermedio: 15-17 mm; Sensible ≥18 mm); **CD2:** Clindamicina, 2 µg (Resistente ≤14 mm; Intermedio: 15-20 mm; Sensible ≥21 mm) **E10:** Estreptomina (10ug): <11 resistente, 12-14 intermedia, >15 sensible. **CIP5:** Ciprofloxacina (5ug): <15 resistente, 16-20 intermedia, >20 sensible.

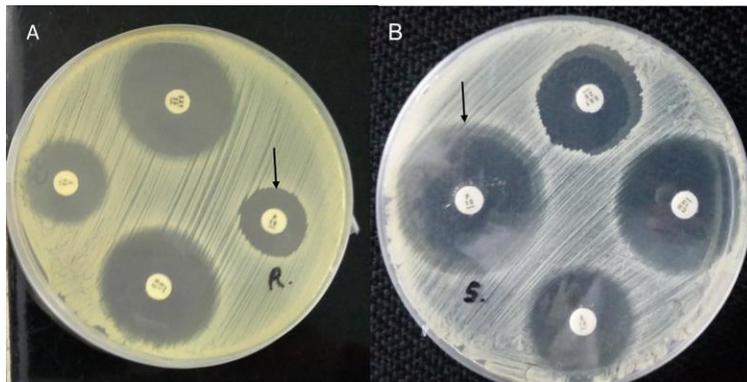


Figura 6. Antibiograma de *S. aureus* realizado mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Flechas indican: A: Cepa penicilino resistente. B: Cepa penicilino sensible.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima y mínima bactericida en células planctónicas

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas y mínimas bactericidas para: Penicilina-Estreptomicina, Sulfadimetoxina-Trimetoprima y Gentamicina, en las 3 cepas en estudio y también para las cepas de referencia. Los resultados se muestran en el Cuadro X y XI.

Cuadro X. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las células planctónicas para los antibióticos en estudio.

Cepa	E10	+	P0	Sulfa	+	TMP	GEN10
90333	3,81		3,05	2,85		0,61	1,22
90108	1,91		1,53	5,70		1,22	1,22
90317	7,63		6,10	2,85		0,61	1,22
ATCC 6538	1,91		1,53	2,85		0,61	2,44
ATCC 29213	3,81		3,05	11,40		2,44	2,44
ATCC 25923	3,81		3,05	5,70		1,22	1,22

P10: Penicilina. E10: Estreptomicina. TMP: Trimetoprima, Sulfa: Sulfadimetoxina. GEN10: Gentamicina.

Cuadro XI. Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las células planctónicas para los antibióticos en estudio.

Cepa	E10	+	P0	Sulfa	+	TMP	Gen10
90333	30,52		24,41	22,80		4,88	4,88
90108	61,04		48,83	11,40		2,44	4,88
90317	122,07		97,66	22,80		4,88	2,44
ATCC 6538	30,52		24,41	22,80		4,88	19,53
ATCC 29213	30,52		24,41	45,60		9,77	4,88
ATCC 25923	15,26		12,21	22,80		4,88	9,77

P10: Penicilina. E10: Estreptomicina. COT25: Trimetoprim, Sulfadimetoxina. GEN10: Gentamicina.

Concentración inhibitoria mínima y concentración mínima de erradicación de Biofilm en BHI y leche UHT descremada

Los resultados del análisis de los datos permitieron determinar la mínima concentración inhibitoria de biofilm producido en leche UHT por las cepas, para los antibióticos: penicilina-estreptomicina y gentamicina (Cuadro XII). En cuanto a la CIM de biofilm producido en leche UHT por las cepas para sulfadimetoxina con trimetoprima, así como para todos los biofilms producidos en BHI no fue posible determinarla debido a la insuficiente cantidad de réplicas.

Cuadro XII. Concentración inhibitoria mínima del biofilm producido por las cepas en estudio en leche descremada UHT.

<i>Medio</i>	<i>Cepa</i>	<i>Penicilina/Estreptomicina µg/mL</i>	<i>Gentamicina µg/mL</i>
<i>Leche</i>	090333	244,14 / 195,31	19,53
	090108	122,07 / 97,66	9,77
	090317	122,07 / 97,66	9,77

Con respecto a la concentración mínima de erradicación del biofilm no fue posible determinarla en las condiciones estudiadas dado que las concentraciones requeridas se encontrarían por encima de las evaluadas.

DISCUSIÓN

Hidrofobicidad

La hidrofobicidad es una característica importante en la colonización y desarrollo del biofilm (Rickard et al., 2004; Nazar, 2007). Las bacterias se comportan como partículas hidrofóbicas debido a la carga negativa neta de la superficie y la hidrofobicidad superficial está asociada a la adhesión bacteriana, la cual varía de microorganismo en microorganismo, de cepa a cepa y está influenciada por el medio de cultivo y las estructuras de superficie (Sorongon et al., 1991). Así es que la adhesión aumenta o disminuye con el aumento o disminución de la hidrofobicidad. Adicionalmente, las fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, y las interacciones electrostáticas pueden mediar interacciones de adhesión. La importancia de las interacciones hidrofóbicas en la adhesión inespecífica de las bacterias y de las propiedades ya citadas conduce entonces a la predicción de que las superficies de deslizamiento de las bacterias son hidrofóbicas (Sorongon et al., 1991). Algunos estudios reportan que la formación de biofilms se produce en mayor medida sobre sustratos hidrofóbicos comparados con sustratos hidrofílicos, siendo además un factor relevante en la formación de biofilms por cepas de *S. aureus* (Cerca et al., 2005; Pagedar et al., 2010).

En este estudio todas las cepas resultaron fuertemente hidrofóbicas a excepción de la cepa ATCC 29213, que fue moderadamente hidrofóbica en medio TSB con glucosa al 1%. En este sentido un estudio realizado por Di Ciccio et al. (2014), concluye que de un total de 67 cepas de *S. aureus* formadoras de biofilm, un 64,1% se presentaron fuertemente hidrofóbicas, 31,3% moderadas y un 4,4% de cepas hidrofílicas. Coincidiendo con nuestro trabajo Mamo et al. (1988) reportaron en su estudio que la mayoría de las cepas de *S. aureus* (63%) aisladas de mastitis bovinas fueron hidrofóbicas, además Jonsson y Wadstrom (1984) señalan a *S. aureus* como la especie más hidrofóbica entre los estafilococos.

Autoagregación

La autoagregación resulta crucial en las etapas primarias de la infección, otorgándole protección a las células bacterianas ya instaladas de las defensas del huésped y los tratamientos antibióticos utilizados; esto favorece la persistencia de la enfermedad en el tiempo. (Kerro Deogo et al., 2002; Cucarella et al., 2004; Melchior et al., 2006). La adhesión a las células epiteliales sería además un prerrequisito y un paso crucial para la infección y colonización de la glándula mamaria (Kerro Deogo et al., 2002) y la formación de biofilms (Vila et al., 2008). Con respecto a la autoagregación en nuestro trabajo el análisis estadístico de los datos permitió agrupar a las cepas en tres grupos con diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$). Los grupos se conformaron de la siguiente manera: primer grupo, cepa 090317 (mediana de 77%), segundo grupo cepas 090333 y ATCC 29213 (medianas de 83,8 y 88,5% respectivamente) y por último las cepas 090108, ATCC 6538 y 25923 (con valores de 95,7%, 98,1% y 97% respectivamente). Estos resultados coinciden con los descritos por de los Santos et al.

(2013) donde todas las cepas ensayadas autoagregaron en diferentes niveles. Más allá de la consideración de que los biofilms son la base de las infecciones bacterianas crónicas o persistentes, la adherencia temprana a las superficies abióticas y la adhesión intercelular son pilares para la formación de los mismos (Cucarella et al., 2001). La capacidad de agregación de las bacterias se relaciona con la adherencia ya que está dada por la adhesión de un microorganismo a otro.

Formación de limo

El limo (slime) es una capa de proteínas y polisacáridos que rodea las bacterias de ciertas cepas de estafilococos y de otras especies, que son capaces de producirla bajo ciertas condiciones ambientales. Las bacterias se hallan inmersas en dicha matriz que, aunque no se encuentra fijada firmemente a la superficie celular (Beveridge y Graham, 1991), se encuentra vinculada a la adherencia a las superficies inertes, la colonización y virulencia de las cepas que lo presentan así como a la formación de biofilm (Baselga et al., 1993; Giridhar et al., 1994; Cifrian et al., 1995). En este sentido, según Baselga et al. (1993) las cepas formadoras de limo presentan una mayor capacidad de adherencia, mientras que las no formadoras son más virulentas pero menos adherentes. Además, algunos investigadores han determinado que la producción de limo por cepas de *S. aureus* influye positivamente en su poder de colonización y resulta fundamental en el establecimiento de la infección (Baselga et al., 1993; Ammendolia et al., 1999).

En este estudio todas las cepas produjeron limo, resultados similares a los obtenidos por Vasudevan et al. (2003) quienes reportaron que 32 de 35 aislamientos de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis produjeron limo. Además en nuestro trabajo todas las cepas produjeron biofilm (aunque en distintos grados), atributos no siempre asociados (Vasudevan et al., 2003). Por ejemplo, Oliveira et al. (2006), utilizando también la técnica de determinación de producción de limo en Agar Rojo Congo (CRA) mostraron que sólo el 37.5% de los aislamientos de *S. aureus* productores de biofilm fueron también productores de limo.

Con respecto a la relación entre la hidrofobicidad y la producción de limo, en este trabajo la mayoría de las cepas fueron fuertemente hidrofóbicas y produjeron limo. Ay et al. (2010) encontraron una relación entre la producción de limo y la hidrofobicidad, las cepas productoras de limo presentan mayor hidrofobicidad que las cepas no productoras, resultados coincidentes con los obtenidos en este trabajo en el cual todos los aislamientos produjeron limo y se clasificaron como fuertemente hidrofóbicos.

Determinación de genes asociados a la capacidad de formación de biofilm

Las características fenotípicas pueden surgir de diferentes determinantes genéticos, la evaluación de la formación biofilm a nivel genético es de importancia ya que existe una correlación favorable entre la expresión fenotípica (producción de biofilm) y la presencia de genes que lo favorecen (BAGs). También ha sido reportado que la presencia de estos genes en *S. aureus* tiene un rol importante en la patogénesis y la producción de biofilm (He et al., 2014). La implicancia de los biofilms en infecciones crónicas de la glándula mamaria ha desencadenado un creciente interés en la caracterización de los

genes involucrados en la formación de biofilms (Gotz, 2002). El estudio de genes asociados a la formación de biofilms es necesario para investigar la bases moleculares y el mecanismo de patogénesis de la infección crónica causada por *S. aureus* (Cucarella et al., 2004).

La adhesión es el primer paso para la formación de biofilms y está regulada por genes de adhesión tales como *fnbpA*, *fnbpB* (que codifican para las proteínas de unión a fibronectina A y B, Tsompanidou et al., 2012). La principal función de la fibronectina es probablemente la capacidad para mediar la adhesión al sustrato de la mayoría de las células eucariotas. En el presente trabajo el gen *fnbpA* se encontró en todas las cepas estudiadas (Figura 3). Esto es similar a lo reportado por Klein et al. (2012) quien informa que de 85 cepas aisladas de vacas con mastitis subclínica en el sur de Brasil, el 63,5% poseía los genes *fnbp* (A y B). Por otra parte un estudio realizado por Lammers et al. (1999) describe que cepas de *S. aureus* deficientes en la expresión de las proteínas de unión a fibronectina (*fnbpA* y *fnbpB*) fallaron al aglutinarse y su capacidad de adherirse e invadir las células de la glándula mamaria bovina se mostró fuertemente reducida. Esto indica que las proteínas de unión a fibronectina son esenciales para la adhesión y la invasión de células de la glándula mamaria. Si bien existe escasa información sobre la prevalencia de los genes codificantes de *fnbp* en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas y sobre su papel específico en la colonización de la glándula mamaria, los estudios realizados indican la importancia potencial de estos antígenos como blancos para el desarrollo de vacunas contra infección intramamaria por *S. aureus* (Camussone et al., 2013). En este sentido, Shina et al. (2000) reportaron que en infecciones por *S. aureus*, cuando se bloquea el sitio de unión entre la proteína bacteriana y la fibronectina celular, las propiedades invasivas quedaban seriamente reducidas, lo que permitiría desarrollar estrategias para el control y prevención de las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* como las ya nombradas.

Por otra parte, la proteína asociada a la formación de biofilm, *Bap*, es la primera proteína de la superficie de *S. aureus* directamente involucrada en la formación de biofilms en superficies abióticas (Valle et al., 2003; Otto, 2008). Esta se ha encontrado principalmente en cepas aisladas de mastitis bovina y su expresión podría mejorar la adherencia intramamaria y la formación de biofilm (He et al., 2014). Además, su presencia en cepas de *S. aureus* responsables de mastitis subclínica sugiere que esta puede mejorar la adherencia y la formación de biofilms intramamarios, lo que conduce a la ineficacia del tratamiento antibiótico contra las bacterias que en ellos se encuentran y contribuye a la cronicidad de la patología. En este trabajo las cepas de *S. aureus* identificadas como 090333 y 090317 presentaron el gen *bap*. Resultados similares fueron obtenidos por Felipe et al. (2013) donde el gen *bap* se detectó en aproximadamente un 3% de los aislamientos de mastitis subclínica y 30% de los aislamientos en el caso de mastitis clínicas. Sin embargo, en los aislamientos de infecciones crónicas se encontró que el 100% expresaron el gen *bap*. Además Felipe et al. (2013) demostraron que la capacidad fenotípica y genotípica de formación de biofilm de aislamientos de *S. aureus* provenientes de bovinos, varía según el tipo de infección establecida. Esto coincide con nuestro trabajo en el que solo dos cepas fueron positivas a este gen las cuales fueron aisladas de vacas con mastitis subclínica. Según un

estudio realizado por Cucarella et al. (2004) aislamientos *bap* positivos fueron significativamente más eficientes en colonizar y persistir en la glándula mamaria bovina *in vivo* y fueron menos susceptibles a tratamientos con antibióticos cuando formaron biofilms *in vitro*. En este sentido, la expresión de la proteína conduce a la formación del biofilm y al bloqueo de las adhesinas de superficie de *S. aureus*, facilitando la persistencia pero dificultando la colonización de nuevos tejidos. Por lo contrario, la ausencia en la expresión de *bap* facilita que la bacteria abandone el biofilm y colonice nuevas regiones de la mama (Úbeda et al., 2002).

El gen *icaADBC*, operón presente en *S. aureus* (Cramton et al., 1999), participa en la formación de biofilms mediante la codificación de proteínas relacionadas con la síntesis de la matriz de exopolisacáridos del biofilm, (llamado PIA) compuesto por 1-6 N-acetilglucosamina (Mack et al., 1996; Maira-Litran et al., 2002). La adhesión intercelular consistente en que los genes *icaABC* y *D* codifican las proteínas que median la síntesis de PIA y PS/A en especies de estafilococos (Cramton et al., 1999). Entre los genes *ica*, los *icaA* e *icaD* tienen un papel muy importante en la formación de biofilms en *S. aureus* y *S. epidermidis*. El gen *icaD* se ha informado que desempeña un papel crítico en la expresión máxima de N-acetilglucosaminiltransferasa, que conduce a la expresión fenotípica del polisacárido capsular (Gerke et al., 1998). El locus *ica* se ha detectado en mayoría de las cepas de *S. aureus* aislados de mastitis clínica, lo que indica su papel como potencial factor de virulencia en la patogénesis de la mastitis en rumiantes (Milanov et al., 2010). Así, Vasudevan et al. (2003) reportó que genes *ica* asociados a cepas productoras de biofilm estaban presentes en un total de los aislamientos de *S. aureus*, obtenidos de la secreción de la glándula mamaria bovina inflamada. En contraposición, en este trabajo no se encontró la presencia del gen *IcaD* en ninguna cepa estudiada. Datos similares fueron obtenidos por Felipe et al. (2013) el cual evaluó la distribución de los genes asociados a la formación de biofilms, aproximadamente un 40% de los aislamientos de infecciones subclínicas presentaron los genes *icaA* e *icaD*, mientras que en los aislamientos provenientes de casos clínicos y crónicos, la totalidad mostraron ambos genes, lo que sugiere que la presencia de este estaría asociada a infecciones clínicas y crónicas, condiciones no estudiadas en este trabajo.

En resumen, la formación de biofilms en cepas *S. aureus* es un complejo mecanismo controlado por múltiples genes. El conocimiento en la regulación de estos genes ofrecerá una base importante y medios para el control y prevención de la formación de biofilms en los casos de mastitis bovina.

Formación de Biofilm en diferentes medios de cultivo

La mayoría de los microorganismos prefieren un modo de vida en el que la población se encuentre fijada sobre un soporte (Biofilm), más que un modo de vida libre y aislado en el medio ambiente (estado planctónico). Mientras que los microorganismos en estado planctónico son importantes para la proliferación y difusión de su comunidad bacteriana, la población sésil es la que favorece la persistencia microbiana en un determinado ambiente (Clutterbuck et al., 2007).

En este trabajo al estudiar la formación de biofilm a las 12 horas de incubación todas las cepas fueron clasificadas como débiles productoras de biofilm tanto en TSB glucosa al 1% como con TSB lactosa al 1%. Resultados similares son obtenidos cuando las mismas son incubadas durante 24 horas, tanto para TSB glucosa al 1% como para leche UHT. En este tiempo de incubación la mayoría de las cepas cultivadas en TSB con lactosa al 1%, resultaron no productoras de biofilms. Estos resultados son similares a los obtenidos por Milanov et al., (2009) donde de un total de 70 cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis subclínica, únicamente 9 cepas fueron fuertemente formadoras de biofilm, y donde el 57% de ellas resultaron débiles formadoras. Un aspecto importante a considerar en cuanto a la formación de biofilm en el tiempo es que en este trabajo la formación de biofilm se evaluó en 2 puntos a las 12 y 24hs. Sin embargo de los Santos (2014) estudiando la cinética de producción de biofilm de aislamientos de *S. aureus* provenientes de mastitis subclínica entre los cuales se encuentran los utilizados en este trabajo, determinó que la cinética era diferente dependiendo de la cepa y todas las cepas se comportaron de manera diferente dependiendo del tiempo establecido.

Los resultados de este trabajo indicaron que la cantidad de biofilm producida se asocia al medio de cultivo, a la cepa y al tiempo, existiendo una interacción entre ellos. Para el tiempo de incubación de 12 horas no existieron diferencias significativas entre cepas, ni entre los diferentes medios de cultivo. En la formación del biofilm de 24 horas no se constatan diferencias significativas entre las cepas pero si se observa un efecto significativo al emplear diferentes medios de cultivo. Las cepas cultivadas en leche UHT presentaron valores de DO superiores a las cepas cultivadas en TSB suplementado con glucosa o lactosa respectivamente. Los tratamientos en diferentes medios afectaron la formación de biofilm.

En cuanto a la composición del medio, esta es un factor importante que influye en la capacidad de las bacterias para producir biofilm bajo condiciones *in vitro* (Knobloch et al., 2009; Deighton et al., 2001; Rohde et al., 2001). Esto se investigó en numerosos estudios y los resultados mostraron que BHI en algunos casos suele ser mejor que TSB para el crecimiento y formación de biofilm por parte de *S. aureus* (Mathur et al., 2006; Knobloch et al., 2002; Stepanovic et al., 2003), aunque también ha sido demostrado que algunas cepas de estafilococos producen mayores cantidades de biofilm en TSB, mientras que otros lo hacen en BHI. Sin embargo, TSB es el medio más utilizado para la formación de biofilm por *S. aureus* (Baldassarri et al., 2001; Cramton et al., 2001; Deighton et al., 2001; Ziebuhr et al., 2001). La suplementación del medio con glucosa aumenta la capacidad de los estafilococos para formar biofilm (Baldassarri et al., 2001; Mathur et al., 2006). Knobloch et al. (2002) hizo hincapié en que la suplementación de medios (TSB o BHI) con diferentes azúcares (glucosa, sacarosa) aumentó la formación de biofilms de manera significativa. Por lo tanto un medio líquido (TSB o BHI) suplementado con un adicional de 0,25% a 4% de glucosa es utilizado con frecuencia (Mathur et al., 2006). Según un trabajo realizado por Xue et al. (2014) en el cual evaluó la producción de biofilm en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis clínica cuando al medio de cultivo se le agregaba lactosa o leche, como resultado obtuvo que la producción de biofilm se incrementó significativamente.

La capacidad de formar biofilm por cepas de *S. aureus* de mastitis bovina, no sólo tiene importancia desde el punto de vista de la patogenicidad en el animal, si no que esta habilidad se extrapola a las industrias lácteas, donde el microorganismo puede adherirse y persistir ante condiciones adversas, mediante biofilms a las estructuras abióticas de procesamiento de alimentos, facilitando el establecimiento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). 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 biofilm de *S. aureus* (Rode et al., 2007).

Caracterización de la formación del biofilm en el tiempo

En las últimas dos décadas, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, como se creía, sino que, la mayor parte del tiempo, pueden encontrarse formando parte de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos pluricelulares, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan. A estas estructuras biológicas se las denomina biofilms. En este sentido la microscopía láser confocal de barrido (CLSM) y el análisis de imágenes son herramientas que han contribuido a facilitar la comprensión visual estática y la arquitectura de los biofilms (Renslow et al., 2011). El desarrollo en biofilm es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. En la actualidad se considera que en condiciones ambientales adecuadas, la mayoría los microorganismos son capaces de formar biofilms (Donlan, 2002; Lasa et al., 2009). Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y diversos productos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda et al., 2005). Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm se puedan encontrar diferentes ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno sea distinta. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad del estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Lasa et al., 2009).

En este trabajo las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal mostraron que a las 24 y 48 horas *S. aureus* ocupa la totalidad de la superficie del cubre objeto, mostrando un patrón de distribución homogéneo. En las diferentes imágenes analizadas, la madurez y complejidad estructural de los biofilms es mayor que cuando los microorganismos se desarrollan individualmente, observando conglomerados complejos poco uniformes adheridos sobre la superficie. A las 24 hs (Figura 4: A) no se observaron bacterias muertas, se presenta mucha marcación inespecífica de color

verde probablemente debidas a la leche y que conforman la matriz extracelular. El biofilm ocupa la totalidad de la superficie a las 48 hs (Figura 4: B) alcanzando su mayor complejidad estructural y madurez observándose una comunidad de conglomerados verde fluorescente. Las múltiples estructuras dejan espacios que son ocupados por las agrupaciones cocoides de las bacterias tanto vivas como muertas.

Susceptibilidad antibiótica de las células planctónicas

En los últimos años la resistencia antimicrobiana ha recibido mayor atención debido a su intensificación alarmante y su difusión en todo el mundo. A pesar del incremento de la resistencia a los antimicrobianos, los esfuerzos dedicados al descubrimiento y el desarrollo u optimización de las terapias antibióticas actuales han disminuido en las últimas dos décadas. El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos es inevitable e inherente a los mecanismos notables de adaptación de las bacterias a condiciones ambientales adversas con el fin de sobrevivir. Así, una de las razones por las que existe una falla terapéutica al emplear antibióticos para tratar infecciones bacterianas es el surgimiento de bacterias resistentes a estas drogas (Sánchez, 2006). El aumento en la resistencia a los antimicrobianos en cepas bacterianas ha coincidido con su uso a gran escala (Faria Reyes et al., 2002). Para seleccionar adecuadamente un antimicrobiano, no sólo se necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su sensibilidad a los antibióticos disponibles en el mercado. Dentro de los más utilizados en los casos de mastitis, están los betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas (Watts et al., 1995), sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes, ocasionando, en algunos casos, fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del animal (WHO, 2000). En el caso particular de los patógenos que afectan a la glándula mamaria, se ha informado a nivel internacional un aumento de la resistencia a los antimicrobianos de uso habitual en casos de mastitis. Así por ejemplo, en un estudio realizado en cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes rodeos lecheros en Finlandia, se determinó un incremento de la resistencia antibacteriana del 36.9% a un 63.6% entre los años 1988 y 1995 (Myllys et al., 1998). El comportamiento de los estafilococos frente a antimicrobianos es muy variable, al haber demostrado una elevada tolerancia y adaptabilidad frente a varias drogas antibacterianas, en especial a las penicilinas.

Según un trabajo realizado por Giannechini et al. (2014) Uruguay mantiene un alto nivel de prevalencia de casos de mastitis subclínica en el rodeo lechero y confirma a *S. aureus* como el principal agente etiológico con un alto porcentaje de resistencia a penicilina. Las penicilinas son antibióticos del grupo de los betalactámicos empleados profusamente en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles. La mayoría de las penicilinas son derivados del ácido 6-aminopenicilánico, difiriendo entre sí según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino. Son antibióticos que actúan contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas. Luego de la administración parenteral, intramuscular o subcutánea las penicilinas se absorben rápidamente, se distribuyen a casi todo el organismo y alcanzan niveles muy altos en pulmones, riñones, útero, ubre e hígado. Debido a que la penicilina ha sido el

tratamiento de elección para los casos de mastitis bovina desde los años 40 las investigaciones realizadas a nivel mundial reportan este fenotipo de resistencia como el más comúnmente observado en cepas de *S. aureus* de origen bovino (Guardabassi y Courvalin, 2006). La producción de β -lactamasas es el mecanismo más común de resistencia a la penicilina en los estafilococos (Giannechini et al., 2014). Estas son enzimas bacterianas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, dejándolo inactivo antes de su unión con su sitio blanco, siendo incapaz de inhibir la síntesis de la pared celular (Babic et al., 2006). Según un trabajo realizado por Kutchynskaya et al. (2010) en Venezuela, de un total de 81 cepas de *S. aureus* aisladas de leche de vacas con mastitis subclínica, 12,4 % de las cepas fueron resistentes a penicilina y todas las cepas resistentes a penicilina fueron productoras de β -lactamasas.

En este trabajo todas las cepas fueron sensibles a los antibióticos utilizados a excepción de una (090333) que resultó resistente a penicilina. Datos similares fueron obtenidos por de los Santos et al. (2013) de un total de 20 cepas aisladas de mastitis bovina (incluidas las utilizadas en el presente trabajo) 5 resultaron resistentes a penicilina (representando 20% de los aislamientos, excluyendo las cepas ATCC usadas como controles). En este sentido San Martin et al. (2002) estudió la resistencia bacteriana en cepas patógenas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en el cual se observaron valores elevados de resistencia (> 25%) frente a penicilina, en las cepas aisladas de las regiones en estudio. En un trabajo realizado por Olivares Guerra (2008), de un total de 81 cepas aisladas de *S. aureus* la mayor resistencia (12,4%) se observó frente a penicilina, resultados que coinciden con los obtenidos por diversos autores a nivel mundial (Erskine et al., 2004; Betancourt et al., 2003; Sabour et al., 2004; Kutchynskaya et al., 2010).

Con respecto a la estreptomycin, este fue el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglucósidos. Se describen tres mecanismos de resistencia frente a los aminoglucósidos son: inactivación enzimática, alteración de la permeabilidad y modificación del sitio de acción, es decir, la sub-unidad 30s del ARN ribosomal. El mecanismo más común de resistencia a los aminoglucósidos por parte de *S. aureus* es la modificación estructural del antibiótico por enzimas modificadoras específicas, lo cual compromete la unión del antibiótico con su sitio de acción (Werckenthin et al., 2001). Este es uno de los aminoglucósidos más usados para el tratamiento y control de la mastitis bovina por *S. aureus* utilizándose solo o en combinación con otros antibióticos, como la penicilina. En nuestro trabajo ninguna cepa resulto resistente a estreptomycin. Datos similares se reportaron por Kutchynskaya et al. (2010) donde solamente 4 cepas de un total de 81 presentaron resistencia a estreptomycin, lo que se traduce como un porcentaje muy reducido.

Por otra parte, la sensibilidad a los antibióticos expresada en términos de concentración inhibitoria mínima (CIM) y/o concentración bactericida mínima (CBM) proporciona resultados cuantitativos que no pueden ser obtenidos a través del método de difusión en agar de Kirby-Bauer. Estos resultados cuantitativos son útiles en la predicción de los niveles de antibióticos en tejidos, sangre u orina que se deben alcanzar para asegurar la inhibición del crecimiento bacteriano o la eliminación del microorganismo (Garg et al.,

2010). La CIM, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La determinación de esta concentración es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos (Andrews, 2001). La CBM se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas) y resulta de utilidad cuando es necesario determinar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

En este trabajo la CIM para el compuesto en base a penicilina-estreptomina fue determinado para todas las cepas y se encontró en un rango entre 1,53-6,10 µg/mL y 1,91-7,63 µg/mL respectivamente. Para explicar el funcionamiento de la asociación penicilina-estreptomina, sería conveniente fundamentar el sinergismo que se establece a nivel del mecanismo de acción de estos agentes. La penicilina actúa a nivel de la pared bacteriana y, por ese efecto puede favorecer el pasaje de la estreptomina al interior de la bacteria. La estreptomina, por su parte, cuando establece su actividad a nivel del ribosoma 30s altera la síntesis de proteínas, lo que repercute a varios niveles dentro de la célula bacteriana, siendo uno de ellos, la alteración de membrana y de sus características de permeabilidad. Esta alteración, favorece la entrada del mismo antibiótico y también de la penicilina. Es por todas estas razones que existe entre estos dos antimicrobianos se establece un sinergismo.

En cuanto a la Gentamicina es también un aminoglucósido, el cual inhibe la síntesis proteica actuando sobre la unidad 30s ribosomal. Su mecanismo de resistencia más común, al igual que para estreptomina, es la modificación estructural del antibiótico por enzimas modificadoras específicas, lo cual compromete la unión del antibiótico con su sitio de acción (Werckenthin et al., 2001). En este trabajo ninguna de las cepas ensayadas presentó resistencia frente a gentamicina. Coincidiendo con varios estudios realizados en diferentes países (Argentina, Estados Unidos, Venezuela y Uruguay) en los cuales se observó una sensibilidad total de las cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis subclínica frente a la gentamicina (Trinidad et al., 1990; Owens et al., 1997; François et al., 2000; Gentilini et al., 2000; Giannichini et al., 2002; Faria Reyes et al., 2005). La concentración inhibitoria mínima de las cepas estudiadas para gentamicina se encontró en un rango entre 1,22-2,44 µg/mL.

Trimetoprima y Sulfadimetoxina son dos tipos de antibióticos que por su actividad complementaria suelen utilizarse asociados, recibiendo la asociación el nombre de Sulfatrimetoprim. La trimetoprima es un antibiótico bacteriostático derivado de la trimetoxibenzilpirimidina, mientras que el sulfametoxazol es una sulfonamida de acción intermedia. Ambos actúan sobre la ruta de síntesis del tetrahidrofolato, cuya inhibición provoca finalmente la inhibición de la síntesis de purinas y ácidos nucleicos por las bacterias. La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol asegura una acción bactericida sinérgica contra bacterias Gram positivas y negativas. En nuestro trabajo todas las cepas ensayadas fueron sensibles a Sulfadimetoxina con Trimetoprima,

coincidiendo con los resultados obtenidos por Ruiz et al. (2000), Myllys et al. (1998) y Kutchynskaya et al. (2010) donde se demostró una sensibilidad total hacia el sulfatrimetoprim. El valor registrado en este estudio para la CIM de Sulfadimetoxina-Trimetoprima se encontró en un rango de 2,85-11,40 µg/mL y 0,61-2,44 µg/mL respectivamente.

De los Santos et al. (2013) en su trabajo (con un número acotado de cepas) indico que la resistencia antibiótica en el área estudiada es baja, probablemente debido a un buen manejo de la terapéutica (similar entre los establecimiento). Este dato puede ser sin embargo discutido en lo que respecta a la relación entre los resultados obtenidos en la práctica clínica con respeto a los ensayos *in vitro* (Hoe & Ruegg, 2005). La relación de la susceptibilidad *in vitro* con los resultados de cura clínica no están bien documentados. Algunos estudios muestran poca relación entre perfiles de susceptibilidad *in vitro* y curaciones clínicas pero otros trabajos consideran que es alta si se trata de bacterias Gram positivas (Constable y Morin, 2002).

Concentración inhibitoria mínima (CIMB) y concentración mínima de erradicación de Biofilm (CEMB) en Leche y Medio de cultivo

El tratamiento antimicrobiano de la mastitis generalmente se basa en los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, aplicando el método de difusión en disco o de dilución. Sin embargo, los antibióticos son eficaces en la inhibición de poblaciones de bacterias planctónicas, mientras que las bacterias en el biofilm sobreviven al tratamiento y proporcionan materiales para seguir creciendo. Estudios *in vitro* confirman diferencias entre la sensibilidad a los antimicrobianos de poblaciones planctónicas y biofilms de *S. aureus* (Amorena et al., 1999). La formación de biofilm en aislamientos de *S. aureus* obtenidos de muestras de mastitis esta generalmente asociada con una susceptibilidad antibiótica reducida lo que se atribuye a la disminución en la difusión del antibiótico a través de la matriz del biofilm y las variaciones en el metabolismo bacteriano (Amorena et al., 1999), las bacterias que se encuentran en el interior de biofilms son extremadamente resistentes a los tratamientos antibióticos. Esta resistencia podría explicarse por distintos mecanismos que no serían necesariamente excluyentes unos de otros (Nazar, 2007). Aunque los antibióticos pueden penetrar en el biofilm, no alcanzan una concentración suficiente en algunas partes del mismo. Las bacterias situadas en la base del biofilm son metabólicamente inactivas y por ello resistentes a algunos antibióticos. Amorena et al. (1999) demostraron que en la mayoría de los casos el interior de las capas de biofilm tiende a permanecer intacto luego del desafío con antimicrobianos y que solo las bacterias de la capa externa se ven afectadas por los mismos. Existen mecanismos de degradación activa de los antibióticos que evitan que en algunas partes del biofilm se alcancen concentraciones efectivas. *S. aureus* aislados de mastitis bovina son altamente resistentes a los agentes antimicrobianos cuando crecen en biofilms (Melchior et al., 2007).

En este trabajo se estudió el efecto de diferentes diluciones de antibióticos sobre biofilms de 24 hs producidos por las cepas seleccionadas, en TSB más glucosa al 1% o leche. Los resultados permitieron determinar la CIMB producido en leche UHT por las cepas para los antibióticos: penicilina-estreptomina y gentamicina.

En cuanto al efecto de la penicilina-estreptomicina sobre los biofilms formados de la cepa 090333 en leche los resultados indican que la CIMB se fue de 244,14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para penicilina y 195,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para estreptomicina. Para las cepas 090108 y 090317 en leche los resultados indican que la CIMB fue de 122,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para penicilina y 97,66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para estreptomicina. Esto representa concentraciones de 20 a 80 veces superior a la CIM de las células planctónicas y 1,5 a 10 veces a la CBM de las mismas. En cuanto al efecto de gentamicina para la cepa 090333 en leche la CIMB fue de 19,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cepas 090108 y 090317 mostraron un comportamiento similar obteniéndose la CIMB en el valor de 9,77 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los biofilms producidos por estas cepas fueron más sensibles a la gentamicina en comparación con penicilina-estreptomicina, siendo sus valores de CIMB entre 8 a 16 veces superiores a la CIM de las células planctónicas y 2 a 4 veces superiores a la CBM de las células planctónicas.

En este sentido, algunos autores han demostrado que tanto *S. aureus* aislados de mastitis bovina y *S. aureus* aislados de seres humanos con infecciones clínicas, son 10-1000 veces más resistente a los agentes antimicrobianos cuando crece en biofilm, que en el mismo aislamiento, creciendo en forma planctónica (Amorena et al., 1999; Melchior et al, 2006). Las cepas utilizadas en este trabajo fueron débiles formadoras de biofilm, sin embargo cabe destacar que cepas fuertemente formadoras de biofilm no son necesariamente más resistentes a los antibióticos que las consideradas como débiles productoras de biofilm (Yanick et al., 2013).

En cuanto a la CIMB producido en leche UHT por las cepas para sulfadimetoxina con trimetroprima, así como para todos los biofilms producidos en BHI no fue posible determinarla debido a la insuficiente cantidad de réplicas analizadas.

Con respecto a la CMEB no fue posible determinarla en las condiciones estudiadas dado que las concentraciones requeridas se encontrarían por encima de las evaluadas.

CONCLUSIONES

En cuanto a los atributos de adherencia las cepas se presentaron fuertemente hidrofóbicas, todas tuvieron un porcentaje de autoagregación superior al 75% y todas fueron productoras de limo.

Todos los aislamientos fueron positivos para la presencia del gen *fnbpA*, dos de los aislamientos fueron positivos para el gen *bap* y ninguno presento el gen *icaD*.

En su mayoría las cepas produjeron biofilm débilmente en los medios y tiempos estudiados a excepción del medio TSB más lactosa al 1% a las 24 hs.

La cantidad de biofilm producida se asocia al medio de cultivo, a la cepa y al tiempo, existiendo una interacción entre ellos.

Todas las cepas en estado planctónico fueron sensibles a los antimicrobianos utilizados a excepción de una que mostro resistencia a la Penicilina. Fue posible calcular CIM y CBM de los aislamientos para los antibióticos en estudio.

Con respecto a la susceptibilidad antibiótica del biofilm en leche, la concentración de antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento del biofilm fue superior que la necesaria para inhibir o eliminar a las células planctónicas.

La concentración mínima de erradicación de biofilm no pudo determinarse con las concentraciones de antibiótico utilizadas en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ammendolia M, Di Rosa R, Montanaro R, Arciola C, Baldassarri L. (1999). Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 37: 3235-3238.
2. Amorena B; Gracia E; Monzón M; Leiva J; Oteiza C; Pérez M; Hernández-Yago J. (1999). Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemoth.* 44 (1): 43-55.
3. Andresen S. (2001). Mastitis prevención y control. *Rev inv vet Peru.* 12 (2):55-65.
4. Andrews J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (Suppl. 1):5-16.
5. Arciola C; An Y; Campoccia, D; Donati, M; Montanaro L. (2005). Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J Art Org.* 28:1091-100.
6. Ariznabarreta, A; Gonzalo, C; San Primitivo, F. (2002). Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to *Staphylococci*. *J. Dairy Sci.* 85:1370-1375.
7. Ay S; Güldür T; Tekerekoğlu MS; Otlu B. (2010). Investigation of hydrophobic characteristics of biofilm producer and non-producer *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Mikrobiyol Bul* 44(2):221-230.
8. Babic M; Hujer A; Bonomo R. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updates.* 9: 142-156.
9. Baldassarri L; Bertuccini L; Ammendolia M; Arciola C; Montanaro L. (2001). Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20:343– 345.
10. Barkema H; Schukken Y; Lam T; Beiboer M; Benedictus G; Brand A. (1998). Management practices associated with low, medium, and high somatic cell counts in bulk milk. *J Dairy Sci.* 81:1917-1927.
11. Barkema H; Schukken Y; Lam T; Galligan D; Beiboer M; Brand A. (1997). Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *J Dairy Sci.* 80:1592–1599.
12. Barkema H; Schukken Y; Zadoks R. (2006). Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 89:1877-1895.
13. Baselga R; Albizu I; Amorena B. (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol.* 39(3-4):195-204. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90157-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(94)90157-0) . Fecha de consulta: 18-06-2014.
14. Baselga R; Albizu I; De La Cruz M; Del Cacho E; Barberan M; Amorena B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun.* 61:4857-4862.

15. Bauer A; Kirby W; Sherris J; Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45:493–496.
16. Bayston R; Penny S. (1972). Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus SIIA*: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child. Neurol.* 14: 25-28.
17. Begun J; Sifri C; Goldman S; Calderwood S; Ausubel F. (2005). *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infect Immun.* 73:872–877.
18. Betancourt O; Scarpa C; Villagrán K. (2003). Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX Región de Chile. *Rev Cientif.* (5): 413-417.
19. Beveridge T; Graham L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* 55: 684-705.
20. Biblioni, (2001). Microbial growth in biofilms. En: Doyle R; Colowick S; Kaplan N; Abelson J; Simon M. *Methods in Enzymology*: V. 337. Academic Press.
21. Boerlin P; Kuhnert P; Hussy D; Schaellibaum M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *J Clin Microbiol.* 41:767-771.
22. Bouman M; Hirigoyen D; Bertón A. (1999). Análisis de los resultados de 427 muestras remitidas para aislamiento de bacterias de mastitis y antibiograma. (Study of results from 427 milk samples remitted for bacteriologic cultures and susceptibility testing against antimicrobial agents). *Jornadas de Salud de Ubre, Nva. Helvecia, Uruguay*, 59-68.
23. Brito M; Souza G; Brito J; Arcuri E; Moreira E; Lange C. (2003). Influence of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* on somatic cell counts in both bulk tank milk and individual cows in Brazilian dairy herds.
24. Brouillette E; Talbot B; Malouin F. (2003). The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect Immun.* 71:2292-2295.
25. Cerca N; Pier G; Vilanova M; Oliveira R; Azeredo J. (2005). Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res. Microbiol.*, 156, 506-514.
26. Chaieb K; Mahdouani K; Bakhrouf A. (2005). Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect.* 61(3), 225-230.
27. Chanchaithong P; Prapasarakul N. (2011). Biochemical markers and protein pattern analysis for canine coagulase-positive staphylococci and their distribution on dog skin. *J Microbiol Methods.* 86:175-181.

28. Chole R; Faddis B. (2003). Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 129: 634-636.
29. Christensen G; Simpson W; Bisno A; Beachey E. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37: 318-326.
30. Cifrian E; Guidry A; O'Brien C; Marquardt W. (1995). Effect alpha-toxin and capsular exopolisaccharide on the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured teat; ductal and secretory mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.* 58: 20-25.
31. CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 9a. ed.* CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
32. Clutterbuck, A; Woods E; Knottenbelt, D; Clegg P; Cochrane C; Percival S. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121:1-17.
33. Constable P; Morin D. (2002). Use of antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens isolated from the milk of dairy cows with clinical mastitis to predict response to treatment with cephalosporin and oxytetracycline. *J Amer Vet Med Assoc.* 221(1): 103-108.
34. Costerton J; Stewart P; Greenberg E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
35. Cramton S; Gerke C; Schnell N; Nichols W; y Gotz F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67:5427-5433.
36. Cressier B; Bissonnette N. (2011). Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 94:2171-2184.
37. Cucarella C; Solano C; Amorena B; Lasa I; Penadés J. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation *J. Bacteriol.* 183:2888-2896.
38. Cucarella C; Tormo M; Úbeda C; Trotonda M; Monzón M; Peris C; Amorena B; Lasa I; Penadés J. (2004). Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Imm* 72: 2177-2185.
39. De Beer D; Stoodley P; Roe F. (1994). Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng;* 43: 1131-1138.
40. de los Santos R; Scavone P; Hirigoyen D; Gil A; Zunino P. (2014). Características de adherencia y cinética de biofilms de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis subclínica. XIII Congreso FEPALE, Querétaro, México.
41. de los Santos, R; Fernández M; De Torres E; Gil A; Zunino P. (2013). Factores de adherencia encontrados en *Staphylococcus aureus* aislados de leche de vacas con mastitis subclínica potencialmente asociados con la persistencia de la

infección en el huésped. XLI Jornadas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. pp 109-191.

42. Deighton M; Capstick J; Domalewski E; van Nguyen T. (2001). Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Enzymol*; 336:177–195.
43. Di Ciccio P; Vergara A; Festino A; Paludi D; Zanardi E; Ghidini S; Ianieri A. (2014). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control* 50: 930e936.
44. DIEA. (2011). Estadísticas del sector lácteo 2010. Serie trabajos especiales noviembre, 2011 n° 304. MGAP, Montevideo.
45. Djabri B; Barielle N; Beaudeau F; Seegers H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.* 33:335-357.
46. Donlan R. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 881-890.
47. Donlan R; Costerton J. (2002). Relevant Microorganisms Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Clin *Microbiol Rev.* 15:167-193.
48. Erskine R; Cullor J; Schaellibaum M; Yancy B; Zecconi A. (2004). Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antimicrobial drugs. *Proceedings National Mastitis Council Annual Meeting.* 400-414.
49. Faría Reyes J; Valero-Leal K; D'pool G; García Urdaneta A; Allara Cagnasso M. (1999). Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito.; *Rev Cient.* 2002:15.
50. Felipe V; Somale P; Varroni F; Rodrigues Da Silva E; Bohl L; Morgante C; Porporatto. (2013). Capacidad formadora de biofilm en aislamientos bovinos de *Staphylococcus aureus*. VIII Jornadas de Investigación UNVM.
51. Flint S; Bremer P; Brooks J. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *J Bioadhes Biofilm Res.* 11(1): 81-97.
52. Fox L; Zadoks R; Gaskins C. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107: 295-299.
53. François S; Meregalli S; Sutich E. (2000). Mastitis bovina: tipificación de cocos Gram positivos y determinación de su sensibilidad a quimioterápicos. Disponible en <http://www.e-campo.com>. Fecha de consulta: 23/10/2014
54. Freeman D; Falkiner FR; Keane C. (1989). New method for detecting slime producing by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42:872-874.
55. Gallegos A; Moncada J; (2011). Uso De Extractos De Semillas De Cítricos Para El Control De La Mastitis Bovina.

56. Garg N; Garg K; Mukerji K. (2010). Laboratory manual of food microbiology. New Delhi: Int Pub House. 208p.
57. Gentilini E; Denamiel G; Llorente P; Godaly S; Rebuelto M; DeGregorio O. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci.* 83: 1224-1227.
58. Gerke C; Kraft A; Süssmuth R; Schweitzer O; Götz F. (1998). Characterization of the N-Acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin; *J Biol Chem* 273: 18586-18593.
59. Giannechini R; Concha C; Rivero R; Delucci I; Moreno López J. (2013). Occurrence of Clinical and sub clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet Scand.* 43:221-230.
60. Giridhar G; Kreger A; Myrvik Q; Gristina A. (1994). Inhibition of *Staphylococcus* adherence to biomaterials by extracellular slime of *S. epidermidis* RP12. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 1289-1294.
61. Gordon R; Lowy F. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 46: S350-S359.
62. Gotz F. (2002) *Staphylococcus* and Biofilm. *Mol Microbiol.* 43:1367-1378.
63. Guardabassi L; Courvalin P. (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817534.chap1>. Fecha de consulta: 23-04-15.
64. Hammer Ø, Harper D, Ryan P. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, issue 1, art. 4:9pp. Disponible en: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. Fecha de consulta: 29/08/2014
65. Harmon R. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77: 2103-2112.
66. Haveri M; Hovinen M; Roslöf A; Pyörälä S. (2008). Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Microbiol;* 46: 3728-3735.
67. He J; Wang A; Liu G; Gao J; Ali T y Han B. (2014). Biofilm formation and biofilm associated genes assay of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in China. *Pak Vet J.* 34(4):508-513.
68. Heilmann C; Gerke C; Perdreau-Remington F; y Gotz F. (1996). Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* 64:277-282.
69. Heringstad B; Klemetsdal G; Ruane J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science.* 64:95-106.

70. Hillerton J; Berry E. (2005). Treating mastitis in the cow--a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol.* 98:1250-1255.
71. INALE, Instituto Nacional de la Leche. (2014).
72. International Dairy Federation. (1981.) Laboratory methods for use in mastitis work. Doc.132:1-26.
73. Jonsson P y T Wadstrom. (1984). High surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Curr. Microbiol.* 8:347-353.
74. Kaplan J; Izano E; Gopal P; Karwacki M; Kim S; Bose J y Horswill A. (2012). Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio*, 3(4), e00198-12.
75. Kateete D; Kimani C; Katabazi F; Okeng A; Okee M; Nanteza A; Joloba M; Najjuka F. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: Dnase and Mannitol Salt Agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 09:23.
76. Kerro Dego O; van Dijk J; Nederbragt H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Quart.* 24(4): 181-198.
77. Klein R; Fabres-Klein M; Brito M; Fietto L; Ribon Ade O. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.* 160:183-8.
78. Knobloch J; Horstkotte M; Rohde H; Mack D. (2002). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol*; 191:101–106.
79. Kumar R; Yadav B; Anand S; Singh R. (2011). Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. *Microb Pathogen* 51:31-38.
80. Kutchynskaya Valero-Leal; Valbuena E; Chacón F; Yamelys O; Castro G; Briñez W. (2010). Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del Estado Zulia. *Rev. Científica, FCV-LUZ/Vol. 20 (5): 498 – 505.*
81. Lammers A; Nuijten P; Smith H. (1999). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS microbiology letters.* 180(1): 103-109.
82. Lasa I; Del Pozo J; Penadés J; Leiva J. (2009). Biofilms bacterianos. www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/
83. Le Maréchal C; Jardin J; Jan G; Even S; Pulido C; Guibert J; Hernandez D, François P; Schrenzel J; Demon D; Meyer E; Berkova N; Thiéry R; Vautor E; Le Loir Y. (2011). *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant

isolates causing mild or severe mastitis. *Veterinary Research*, 42:35. Disponible en:<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/35>. Fecha de consulta: 27/08/2014

84. LeBlanc S; Lissemore K; Kelton D; Duffield T; Leslie KE. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci.*(4):1267-1279.
85. López Meza J; Higuera Ramos J; Ochoa Zarcosa A; Chassin Noria O, Valdez Alarcón J, Bravo Patiño A Baizabal; Aguirre V. (2006). Molecular characterization of *Staphylococcus* spp. isolates associated with bovine mastitis in Tarímbaro, Michoacán, *Tec Pecu Mex.* 44: 91-106
86. Lowy F. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med.* 339(8), 520-532.
87. Mack D; Fischer W; Krokotsch K; Leopold R; Hartmann H; Egge y Laufs R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178:175–183.
88. Mah T; O’Toole G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol;* 9:34–39.
89. Maira-Litran T; Kropec A; Abeygunawardana C; Joyce J; Mark III G; Goldmann D; Pier G. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* 70:4433–4440.
90. Mamo W; Froman G; Wadström T. (1988). Interaction of sub-epitelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 18: 163-176.
91. Martel J; Tardy F; Brisabois A; Lailler R; Coudert M; Chaslusdancla E. (2000). The French antibiotic resistance monitoring programmes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 275-283
92. Mathur T; Singhal S; Khan S; Upadhyay D; Fatma T; Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 24:25–9.
93. Mattos-Guaraldi A; Formiga L; Andrade A. (1999). Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol,* 38:37-42.
94. Melchior M; Fink-Gremmels J; Gaastra W. (2006). Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal Vet Med Series B.*53:326–332.
95. Melchior M; van Osch M; Lam T; Vernooij J; Gaastra W; Fink-Gremmels J. (2011). Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J.Dairy Sci.* 94:5926-5937.

96. Middleton J; Fox L; y Smith T. (2001). Management strategies to decrease the prevalence of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218:1615-1618.
97. Milanov D; Lazić S; Vidić B; Petrović J; Bugarski D; Seguljev Z. (2010). Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Vet.* 60(2-3), 217-226.
98. Mittelman M. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.* 81:2760–2764.
99. Montero E. (2001). Situación actual y perspectivas del mercado mundial de los productos lácteos. En: Conferencia Internacional "Aseguramiento de la Calidad en la Industria Láctea". 15 – 20 octubre, San José, Costa Rica. Disponible en: http://www.proleche.com/recursos/documentos/congreso2013/Situacion_actual_y_perspectivas_del_sector_lacteo_a_nivel_mundial_Ing_Erick_Montero_Vargas_Costa_Rica.pdf. Fecha de consulta: 14/08/2014
100. Mullarky I; Su C; Frieze N; Park Y; y Sordillo L. (2001). *Staphylococcus aureus* agr Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities Can Resist Neutrophil Bactericidal Activity. *Infection and Immunity.* 69:45-51.
101. Murray P; Kobayashi G; Pfaller M; Rosenthal K. (1997). *Staphylococcus*, en *Microbiologia Medica*. 2a ed, Madrid, Harcourt Brace 19:166-179.
102. Myllys V; Asplund K; Brofeldt E; Hirvelä – Koski V; Honknanen Buzalski T. (1998.) Bovine mastitis in Finland in 1998 and 1995 – Changes in prevalence and microbial resistance. *Acta vet Scand.*; 39 : 1 : 119– 126
103. Nazar J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev Bibliográfica Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 67: 61-72
104. O’Riordan K; Lee J. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 17(1): 218–234.
105. Ochoa-Zarzosa A; Loeza-Lara P; Torres-Rodríguez F; Loeza-Ángeles H; Mascot-Chiquito N; Sánchez-Baca S; López-Meza J. (2007). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 94(02):199-206.
106. O’Gara J; Humphreys H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* 50: 582-587.
107. Olivares Guerra Y. (2008). Susceptibilidad a los agentes antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de leche de cuartos mamarios y leche de tanque. Trabajo de Grado. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. División de Postgrado. Maracaibo, Venezuela 47 p. Disponible en: http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/59/TDE-2011-06-21T15:34:36Z-1148/Publico/olivares_guerra_yamelys_argelia.pdf. Fecha de consulta: 15-3-2015.

108. Oliveira M; Bexiga R; Nunes S; Carneiro C; Cavaco L; Bernardo F; Vilela C. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 118:133-140.
109. Öner Z; Ölmez Z. (2011). Biofilm producing microorganisms in dairy industry and prevention of biofilm formation *Akademik Gıda* 9(4):12-16.
110. O'Reilly C; O'Connor P; Kelly A; Beresford T; Murphy P. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl Environ Microbiol* 66, 4890-4896.
111. Østeras O; Edge V; Martin W. (1999). Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J Dairy Sci.* 82, 122-1231.
112. Otto M. (2008). Staphylococcal Biofilms. En: Romeo, T. *Bacterial Biofilm Current Topics in Microbiol Immunol*, Berlin, Springer, pp. 207-228.
113. Owens W; Ray C; Watts J; Yancey R. (2007). Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 80: 313-317.
114. Pagedar A; Singh J; Batish V. (2010). Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences it survival in preformed biofilms. *J. Basic Microbiol.* 50: S98eS106.
115. Pascual M; Calderon V. (1992). Investigación y recuento de *Staphylococcus aureus*. En: Pascual M; Calderon V. *Microbiología alimentaria*. Madrid; ed. Díaz de Santos, pp: 63-70.
116. Philpot W; Nickerson S (1993). Mastitis: El contraataque. *Surge International Babson Bros Ed., Ill., USA.*2.
117. Pol M, Ruegg P. (2007). Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci.* 90:249-261.
118. Post J; Stoodley P; Hall-Stoodley L; Ehrlich G. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 12: 185-90.
119. Potera C. (1999). Forging a link between biofilms and disease. *Sci.* 283: 1837-9.
120. Pyörälä S; Pyörälä E. (1994). Efficacy of bovine clinical mastitis therapy during lactation. *Proceedings; XVII Nordic Veterinary Congress; 26-29 July; Reykjavik; Iceland.*
121. Rabello R; Souza C; Duarte R; Lopes R; Teixeira L; Castro A. (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 88:3211-3219.
122. Ramadan H. (2006). Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 14(3): 183-6.

123. Renslow R; Lewandowski Z; Beyenal H. (2011). Biofilm image reconstruction for assessing structural parameters. *Biotechnol Bioeng.* 108, 1383–1394.
124. Rickard A; McBain A; Stead A; Gilbert P. (2004). Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 70:7426-7435.
125. Robertson J; Williams E. (1994). The epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. Proceedings; 27th annual convention American Association of Bovine Practitioners; 22-25 September; Pittsburgh; USA.
126. Rode T; Langsrud S; Holck A; Møretrø T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol*; 116(3):372-383.
127. Rohde H; Knobloch J; Horstkotte M; Mack D. (2001). Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol.*190:105–109
128. Ruiz J; Ramírez N; Arroyave O. (2001). Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Col Cienc Pec.* 14 (2): 141-152.
129. Sabour P; Gill J; Lepp D; Pacan J; Ahmed R; Dingwell R; Leslie K. (2004). Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J Clin Microbiol.* 42: 3449-3455.
130. Saini V; McClure J; Scholl D; DeVries T; Barkema H. (2012). Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 95:1921–1929.
131. San Martín B; Kruze J; Morales M; Agüero H; Leon B; Espinoza S; Iragüen D; Puga J; Borie C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Arch Med Vet.* 34(2): 221-234.
132. Sanclement J; Webster P; Thomas J; Ramadan H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 115: 578-582.
133. Sanderson A; Leid J; Hunsaker D. (2006). Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 116: 1121-1126.
134. Schlapp G; Scavone P; Zunino P; Härtel S. (2011). Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *J Microbiol Methods.* 87:234-40.
135. Schrick F; Hockett M; Saxton A; Lewis M; Dowlen H; Oliver S. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84:1407-1412.

136. Scott C y Manning S. (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J.* 82 (suppl): 18-20.
137. Seegers H; Fourichon C; Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475–491.
138. Sharma M; Anand S. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19(6):627–636.
139. Sibbald M; Ziebandt A; Engelmann S; Hecker M; De Jong Harmsen A; Raangs G; Stokroos I; Arends J; Dubois J; van Dijl J. (2006). Mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol R.* 70:755-788.
140. Simões M; Simões L; Vieira M. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci Technol.* 43:573–583.
141. Singh P; Schaeffer A; Parsek M. (2000). Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 407: 762-4.
142. Sinha B; François P; Nübe O; Foti M; Hartford O; Vaudaux P; Krause K. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cel microbiol.* 1(2), 101-117.
143. Sixtos E. (2011). Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán.
144. Smith K; Hogan J. (1998). The world of mastitis. Proc. 2nd Intern. Symp. Mastitis and Milk Quality. 2001, Vancouver, British Columbia, Canada. P.1-12.
145. Sol J; Sampimon O; Barkema H; Schukken Y. (2000). Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 83, 278–284.
146. Sorongon M; Bloodgood R; Burchard R. (1991). Hydrophobicity adhesion and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Appl Environ Microb.* 57:3193-3199.
147. Souto M; Ferreirós C; Criado M; Sáinz V; Carballo J; Del Río M. (1989). Influencia del limo ("slime") en la resistencia a los antibióticos y a la acción del suero humano en cepas de *Staphylococcus epidermidis*. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 4: 565-568.
148. Stepanović S; Vuković D; Hola V; Bonaventur G; Djukić S; Ćirković I; Ruzicka F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8): 891-899.
149. Stephan R; Rusch P. (1997). Current resistance status of *Escherichia coli* strains from bovine mastitis milk samples. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 139: 495-499.
150. Stewart P. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms *International J Medi Microbiol.* 292(2), 107-113.
151. Stewart P; Costerton J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet.* 358(9276), 135-138.

152. Sutra L; Poutrel B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 40:79-89.
153. Takamatsu D; Hata E; Osaki M; Aso H; Kobayashi S; Sekizaki T. (2008). Role of SraP in Adherence of *Staphylococcus aureus* to the Bovine Mammary Epithelia. *J Vet Med Sci.* 70(7):735–738.
154. Taponen S. (2008). Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. Tesis Doctoral. Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine. U Helsinki Finland.
155. Tarabla H. (2000). Epidemiología diagnóstica. Santa Fe, Centro de Publicaciones - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina; 120 pp.
156. Tessi M; Comini L; Esponda R; Taher M; Paura A; Moguilevsky M; Casado N; Silva M. (1981). Evaluación de la calidad microbiológica de leche cruda. *Revista del I.N.T.A.* 3: 115-127.
157. Thomas J; Nakaishi L. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 137(suppl): 10S-15S.
158. Trinidad P; Nickerson C; Luther D. (1990). Antimicrobial susceptibilities of *Staphylococcal* species isolated from mammary glands of unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73: 357-362.
159. Tsompanidou E; Denham E; Sibbald M; Yang X; Seinen J; Friedrich A; Buist G y van Dijn J. (2012). The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 7: 44646.
160. Türkyilmaz S; Kaya O. (2006). Determination of some Virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolated from various clinical samples. *Turk J Vet Anim Sci.* 30:127-132.
161. Úbeda C; Tormo A; Cucarella C; Trotonda P; Foster T; Lasa I; Penadés J. (2003). Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol.* 49(1): 193–210.
162. Valle J; Toledo-Arana A; Berasain C; Ghigo J; Amorena B; Penadés J; Lasa I. (2003). SarA and sigma b not is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 48: 1075-1087.
163. Van Houdt R y Michiels C. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol.* 109(4): 1117-1131.
164. Vasudevan P; Kumar M; Nair M; Annamalai T; Venkitanarayanan K. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 92:179-185.
165. Veeresh B; Nuthanalakshmi V; Akshatha B; Sundareshan S; Rathnamma D; Sharada R; Mukkur T; Hegde N; Isloor S. (2012). *Staphylococcus aureus* strain KVAFSU-50 biofilm-associated protein (bap) gene, partial cds. Dept. of Vet.

Microbiology, Veterinary College, KVAFSU, Hebbal, Bangalore, Karnataka 560024, India.

166. Vilaa J; Soriano A; Mensa J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26(1):48-55.
167. Watts J; Salmon A; Yancey S; Nickerson C; Weaver L; Hoemberg C; Pankey J; Fox L. (1995). Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J Dairy Sci.* 78: 1637-1648.
168. Wellenberg G; van der Poel W y Van Oirschot, J. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet -rinary Microbiol.* Article 2361, pp. 2-21.
169. Werckenthin C; Cardoso M; Martel J; Schwarz S. (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.* 32: 341-362.
170. WHO. World Health Organization. (2000). Overcoming antimicrobial resistance. WHO. Geneva, Switzerland. 67 p.
171. Xue T; Chen X; Shang F. (2014). Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *J Dairy Sci.* 97:6129–6134.
172. Yannick D; Tremblay; Vincent Caron; Andréanne Blondeau; Serge Messier; Mario Jacques. (2013). Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol.* 172: 511-518.
173. Zadoks R; van Leeuwen W; Kreft D; Fox L; Barkema H; Schukken Y; van Belkum A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol.* 40:3894-3902.
174. Zhang X; Shi Q; Wang S; Su Y. (2010). Clone and sequencing of *Fnbp A* gene of *Staphylococcus aureus* isolated from Xinjiang dairy cow with subclinical mastitis. *Xinjiang Nong Ye Da Xue Xue Bao* 33; 35-39.
175. Ziebuhr W; Heilmann C; Götz F; Meyer P; Wilms K; Straube E; Hacker J. (1997). Detection of the intracellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 65: 890-896.