

## **Producción de Enterotoxina y Biofilm en Aislamientos Clínicos de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina**

*Enterotoxin and Biofilm Production in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

**Ávila R., Yeiny<sup>1</sup>; Ginestre P., Messaria<sup>1\*</sup>;  
Valero L., Kutchynskaya<sup>2</sup>;  
Castellano G., Maribel<sup>1</sup>; Romero A., Sonia<sup>1</sup>;  
López, Alfredo<sup>3</sup>; Rincón V., Gresleida<sup>2</sup>  
y Sandra T., Lisette<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Bacteriología General. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela. <sup>2</sup>Bacteriología Clínica. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela. <sup>3</sup>Cirugía Cardiovascular. Hospital Universitario de Maracaibo-Venezuela. <sup>4</sup>Práctica Profesional de Bacteriología. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela.  
\*messaria@hotmail.com

### **Resumen**

*S. aureus* se ha convertido en un problema de salud pública, debido a la dificultad que representa el tratamiento de las infecciones causadas por SARM. El propósito de esta investigación fue determinar la producción de enterotoxinas A, B, C y D y la producción de biofilm en aislamientos de SARM. Se estudiaron 50 cepas aisladas de diferentes tipos de muestras clínicas. La detección de enterotoxinas se realizó por la técnica de aglutinación en fase inversa y la producción de biofilm mediante: agar rojo congo y el método en microplacas de cultivos celulares. La producción de enterotoxina se observó en 9 cepas (18%), siendo la enterotoxina D (64%) la más prevalente, seguida de la B (27%) y la A (9%). Se demostró una asociación significativa entre la producción de enterotoxina y el tipo de muestra de la que provenía la cepa. La producción de biofilm se constató en 30% y 98% de las cepas por los métodos de agar rojo congo y microplacas de cultivos celulares, respectivamente; sólo en 15 cepas (30%) se ob-

---

Recibido: 08-07-14 / Aceptado: 27-10-14

servó correlación de ambos ensayos, se demostró que el método en microplacas de cultivo celular es más eficaz para detectar la producción de biofilm en *S. aureus*.

**Palabras clave:** *S. aureus* resistente a meticilina, Enterotoxinas, Biofilm.

### Abstract

*S. aureus* has become a public health problem, due to the difficulty of treating infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The purpose of this research was to determine the production of enterotoxins A, B, C and D and the production of biofilm in clinical isolates of MRSA. Fifty MRSA strains isolated from different types of clinical samples were studied. Detection of enterotoxins was carried out using the technique of reversed phase agglutination, while biofilm production was studied through two tests: Congo red agar and the microplate cell culture method. Enterotoxin production was observed in 9 strains (18%); enterotoxin D (64%) was the most prevalent, followed by B (27%) and A (9%). A significant association was shown between enterotoxin production capacity and the type of sample that came from the strain. Biofilm production was found in 30% and 98% of the strains using the Congo red Agar and microplate cell culture methods, respectively. A correlation of both trials was observed in only 15 strains (30%). It was shown that the microplate cell culture method is more effective for detecting biofilm production in *S. aureus* strains.

**Key words:** Methicillin-resistant *S. aureus*, enterotoxins, biofilm.

### Introducción

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una importante causa de infecciones adquiridas tanto en el hospital como en la comunidad que constituye un problema creciente de salud pública, debido a la dificultad que representa el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo, teniendo en cuenta la incidencia creciente de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y, más recientemente, la aparición de resistencia a gluco péptidos (1).

El alto grado de patogenicidad de *S. aureus* está relacionado con la importante producción de enzimas extracelulares que permiten la penetración e invasión de los diferentes tejidos (coagulasa, proteasas, metalo proteasas, hialuronidasas, lipasas y fosfolipasa C). Otros compuestos permiten la adherencia, como son las proteínas de unión a fibronectina, la colagenasa y diversos factores

de agregación. Su persistencia sobretodo en materiales sintéticos (catéteres), está predominantemente inducida por diferentes polisacáridos de adhesión que favorecen la producción de biofilm. Entre las toxinas conocidas destacan las hemolisinas, las diferentes enterotoxinas, la toxina exfoliativa, la toxina del síndrome de choque tóxico (SSTT), otros superantígenos estafilocócicos y finalmente las leucocidinas (2, 3).

Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) constituyen un grupo de proteínas extracelulares de cadenas simples, con bajo peso molecular (26 a 30kDa). Están codificadas por elementos genéticos móviles, como plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad, que facilitan la diseminación horizontal entre poblaciones bacterianas (4, 5). Son hidrosolubles y resistentes a la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina y tripsina, permaneciendo activas después de la ingestión (4). Hasta la fecha, se han descrito 20 tipos diferentes de en-

terotoxinas, que pueden dividirse en dos grandes grupos: 1) las SEs con actividad enterotóxica y emética reconocida; que comprenden las SEs clásicas: SEA, SEB, SEC (con cinco variantes antigénicas: C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>bovina</sub> y C<sub>ovina</sub>), SED, SEE y las SEs G-J; y 2) el grupo de las toxinas similares a enterotoxinas de estafilococos, conformada por 11 toxinas (6).

Las enterotoxinas de *S. aureus* se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y a la región variable de las cadenas  $\beta$  de los linfocitos T; esta interacción da lugar a la estimulación masiva de linfocitos T y producción de grandes cantidades de interleucina 2 que al llegar al torrente circulatorio producen una variedad de síntomas como náuseas, vómitos y fiebre (7).

Además de la enfermedad aguda, los estafilococos son reconocidos como causa frecuente de infecciones asociadas a la producción de biofilm. Esta condición excepcional se debe a que los estafilococos son bacterias comensales frecuentes en la piel y mucosas humanas, capaces de colonizar cualquier dispositivo médico que penetre esas superficies (8).

La producción de biofilm se convierte en un problema de gran impacto en las industrias alimentarias, ambientes hospitalarios y comunitarios en general, ya que se producen en una gran variedad de superficies de contacto que involucra alimentos, tejidos animales con propósito alimenticio o no, tejidos humanos, prótesis, superficies de procesamiento en industrias, entre otros; causando en estos ambientes grandes inconvenientes, tales como: infecciones persistentes, fracaso en tratamientos terapéuticos, fracaso en aseguramiento de alimentos inocuos y en los peores casos pérdidas humanas. Por tanto, surge la necesidad de erradicar los biofilms y sus agentes etiológicos en estos ambientes; ya que su presencia se traduce en grandes pérdi-

das económicas en las industrias y pérdidas humanas en ambientes clínicos (9, 10).

El propósito de esta investigación fue determinar fenotípicamente la producción de enterotoxinas A, B, C y D y la capacidad de producción de biofilm de 50 aislamientos de SARM obtenidos de diferentes tipos de muestras clínicas.

## Material y método

Se estudiaron 50 cepas de SARM aisladas de diferentes tipos de muestras clínicas provenientes de pacientes del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM). A todas las cepas se les determinó la producción de enterotoxinas A, B, C y D mediante la técnica de aglutinación en fase reversa SET-RPLA, Oxoid®; así como también, la capacidad de producción de biofilm, a través de dos ensayos fenotípicos: Cultivo sobre agar rojo congo (ARC) (11) y un ensayo fenotípico cuantitativo: microplacas de cultivos celulares (TCP) (12).

Los datos obtenidos fueron analizados de forma porcentual y organizados en tablas y gráficos. La asociación entre la producción de enterotoxina y el tipo de muestra clínica de la cual provenían las cepas enterotoxigénicas, se determinó mediante la aplicación del estadístico  $\chi^2$  con un grado de confiabilidad del 95%. Se empleó el Software estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versión 19.

## Resultados

La determinación de enterotoxinas A, B, C y D en las 50 cepas de SARM, utilizando el método de aglutinación en fase reversa arrojó los siguientes resultados: en 9 aislamientos se detectó la producción de enterotoxina, representando esto un 18% de positividad.

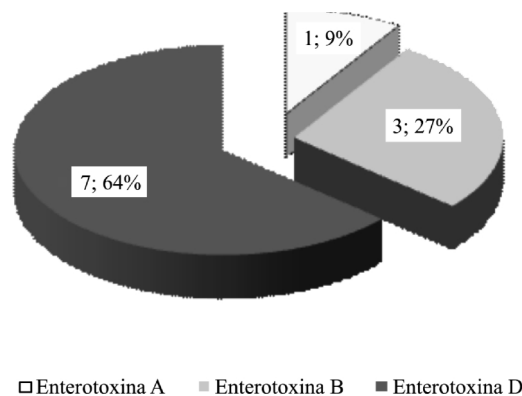
De los 9 aislamientos de SARM enterotoxigénicos, 7 (78%) produjeron sólo una enterotoxina y en 2 (22%) se observó coproducción de dos tipos de enterotoxinas.

La distribución de los tipos de enterotoxinas encontrados en esta investigación se muestra en la Figura 1. No se detectó enterotoxina tipo C en ninguna de las cepas estudiadas. Cabe resaltar, que en dos aislamientos (22%), se evidenció la coproducción de enterotoxina B y D (datos no mostrados).

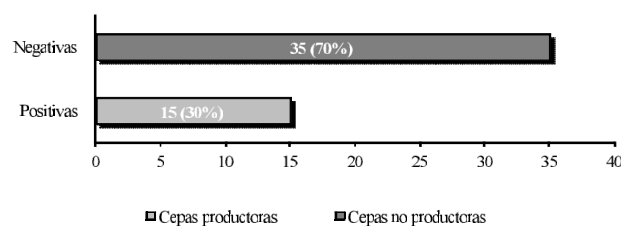
Los 50 aislamientos de SARM estudiados en esta investigación procedían de diferentes tipos de muestras clínicas de pacientes del SAHUM. Los resultados obtenidos en la determinación de enterotoxinas según el tipo de muestra clínica se observan en la Tabla 1. Puede observarse que del total de cepas positivas, el mayor porcentaje de aislamientos enterotoxigénicos provenía de muestras de diferentes tipos de secreciones (heridas, oculares y úlceras).

La interpretación de las colonias sobre el ARC se realizó utilizando la escala colorimétrica propuesta por Arciola et al (13); para lo cual se diferenciaron 5 tipos de colonias: colonias muy rojas (MR), colonias rojas (R), colonias marrones (M), colonias negras (N) y colonias muy negras (MN); clasificándose como cepas fuertemente productoras de biofilm aquellas que mostraron colonias negras y muy negras, débilmente productoras las que presentaron colonias marrones, mientras que, la presencia de colonias rojas y muy rojas correspondieron a cepas no productoras de biofilm.

Entre las cepas de SARM estudiadas se evidenciaron fenotipos productores de biofilm, al observarse colonias muy negras, negras y marrones sobre las placas de ARC después de 48 horas de incubación: 15 (30%) cepas de SARM resultaron positivas a la producción de biofilm a través de este método (Figura 2).



**Figura 1.** Distribución de la producción de Enterotoxina en aislamientos clínicos de SARM.



**Figura 2.** Producción de Biofilm sobre ARC en cepas de *S. aureus* meticilina resistentes.

**Tabla 1.** Distribución de las propiedades enterotoxigénicas de las cepas de SARM según el origen de la muestra.

Muestra	Nº de cepas	Cepas positivas (Nº/%)	Tipo de Enterotoxina				Total
			SEA	SEB	SEC	SED	
Secreción de herida*	19	3/33,3	1	1	—	2	4
Secreción traqueal	9	—	—	—	—	—	—
Sangre	8	1/11,1	—	—	—	1	1
Secreción de abscesos	4	—	—	—	—	—	—
Secreción de oído	1	—	—	—	—	—	—
Secreción ocular*	2	2/22,2	—	1	—	2	3
Secreción de úlceras	5	2/22,2	—	1	—	1	2
Orina	2	1/11,1	—	—	—	1	1
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>11</b>

\*Una cepa presentó coproducción de SEB + SED.

La diversidad y frecuencia de las colonias observadas sobre ARC se muestra en el figura 3. Puede notarse que las 35 (70%) cepas de SARM no productoras de biofilm, desarrollaron colonias rojas y muy rojas en el medio ARC; mientras que, los aislamientos productores de biofilm 15 (30%) mostraron colonias marrones, negras y muy negras.

En las figuras 4 y 5 se observa la distribución y frecuencia de producción de biofilm en las 50 cepas estudiadas, de acuerdo al grado de adherencia a las placas de poliestireno: Los aislamientos de SARM cuyos valores de densidad óptica (DO) oscilaron entre 0,080 y 0,155 fueron clasificados como débil productores de biofilm, las cepas con niveles de DO entre 0,161 y 0,222 resultaron moderadamente productoras de biofilm y los aislamientos con DO entre 0,279 y 0,612 se catalogaron como fuertemente productores de biofilm. Una cepa fue clasificada como no productora de biofilm por su bajo poder adherente al poliestireno (DO 0,073).

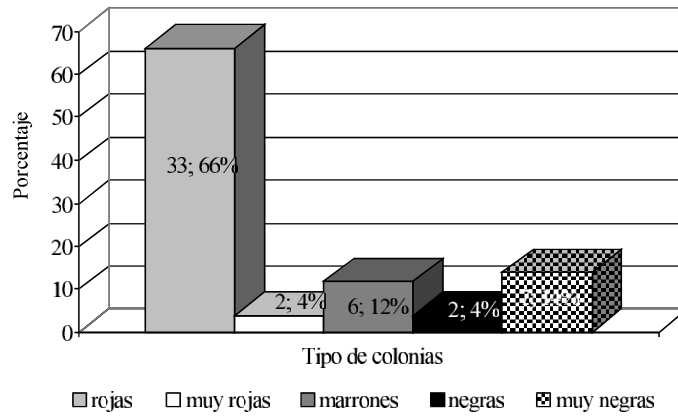
Al comparar los resultados obtenidos en ambos métodos fenotípicos, ARC y TPC (Tabla 2), puede observarse que solo hubo correlación en 15 (30%) cepas de SARM, que resul-

taron positivas para la formación de biofilm a través de los dos métodos utilizados; mientras que, 34 cepas que fueron positivas por la técnica TPC no mostraron fenotipos formadores de biofilm en ARC y sólo un aislamiento fue negativo por ambos métodos.

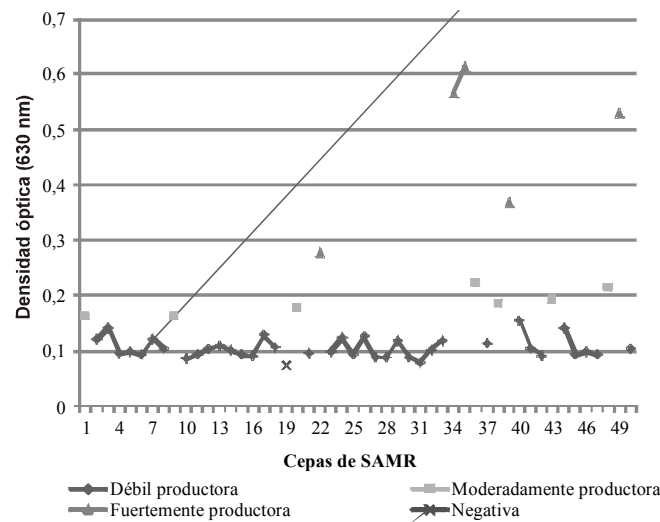
## Discusión

El porcentaje de positividad para detección de enterotoxinas en las cepas de SARM evaluadas fue de 18%. Este resultado difiere de lo reportado por diversos autores en la literatura; así, Coia et al. (14) informaron 55,51% de aislamientos productores de enterotoxinas en cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a meticilina (SASM). Por su parte, Humphreys et al. (15), al estudiar 79 cepas de *S. aureus* (52 aisladas de casos de septicemia y 27 de portadores nasales) reportaron 45,6% de cepas enterotoxigénicas, destacando que 9 cepas de casos de septicemia eran resistentes a meticilina y todas fueron productoras de enterotoxina (5: SEA y SEB; 2: sólo SEA y 2: sólo SEB).

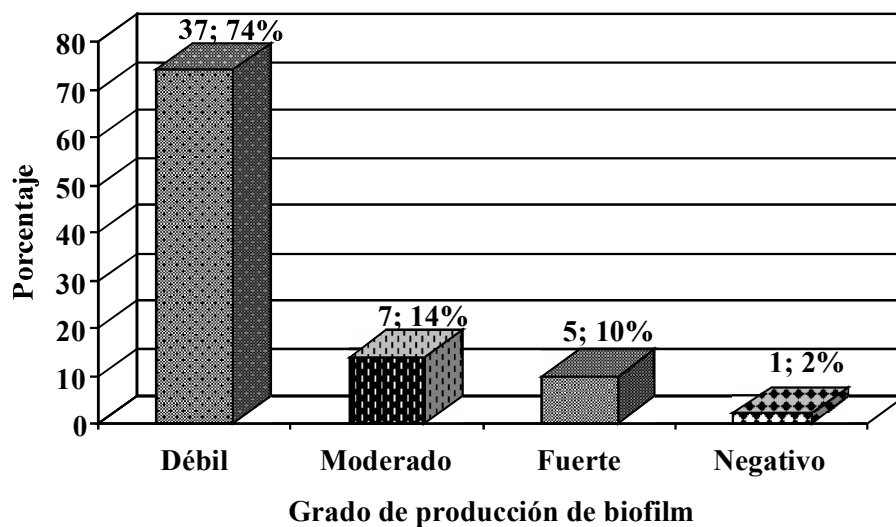
De igual manera, Fueyo et al. (5) y Bonyukara et al. (16) reportan porcentajes de



**Figura 3.** Producción de biofilm en ARC por cepas de SAR.



**Figura 4.** Dispersión de la producción de biofilm en cepas de SARM, según DO. Método de microplacas de cultivos celulares.



**Figura 5.** Grado de producción de biofilm en SARM según su adherencia a microplacas de poliestireno.

**Tabla 2.** Correlación entre los métodos fenotípicos ARC y TPC para la producción de biofilm.

ARC	TPC	
	Positivas	Negativas
Positivas (15)	15	–
Negativas (35)	34	1
Total (50)	49	1

producción de enterotoxinas en aislamientos clínicos de *S. aureus*, que oscilan entre 29-84%; mientras que, Al Bustan et al. (17) y Mehrotra et al. (18), informaron entre 34-87% de positividad en cepas aisladas de portadores asintomáticos.

Diversos autores reportan la enterotoxina A como la más frecuentemente expresada en aislamientos de *S. aureus* provenientes de muestras clínicas humanas, lo cual difiere de lo observado en el presente estudio, donde la enterotoxina más frecuente fue la enterotoxina D (64%). Así, Coia et al. (14), al comparar la producción de enterotoxinas y hemolisinas en SARM y SASM, informaron 89% de cepas de SARM productoras de SEA, seguida de 26% para SEC, 22% SEB y no se encontró ninguna cepa productora de SED. Fueyo et al. (5) reportan 29% de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas y de estas 14 fueron positivas para SEA, 10 para SEC, 2 para SEB, 2 para SED, 1 para SEA + SEC y 4 para SEC + SED.

Humphreys et al. (15), al estudiar la producción de enterotoxinas en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con septicemia y de portadores sanos observaron, en forma general, la producción de SEA en 42% de los aislamientos estudiados, seguido de 44% de SEC, 36% SED y 31% SEB; sin embargo, es importante mencionar que de los aislamientos provenientes de los portadores sanos,

sólo 3 resultaron enterotoxigénicos y todos produjeron SED. Asimismo, Boynukara et al. (16), informaron que de 46 cepas de *S. aureus*, 85% presentaron SEA, 7% SEB, 4% SEC y 4% SED.

De igual manera, otra investigación donde se determinó la presencia de genes que codifican la producción de enterotoxinas clásicas (SEA-SED) y otras de reciente aparición, en aislamientos de *S. aureus* provenientes de manipuladores de alimentos, se reporta al gen *sea*, el cual codifica la producción de SEA, como el más frecuentemente identificado (Rall et al. (19). Sin embargo, Sila et al. (20) y Avanish et al. (21) informan el gen *sed*, que codifica la producción de SED, como el más prevalente dentro de los genes de las SE clásicas.

En este estudio 78% de las cepas fueron monoproductoras de enterotoxinas y en 22% se observó coproducción de dos tipos de enterotoxinas (SED y SEB). Este resultado es similar a lo reportado por Coia et al. (14), quienes informan un 74% de aislamientos de *S. aureus* monoproductoras de enterotoxina y un 26% de cepas con coproducción (2 o más enterotoxinas). Humphreys et al. (15), informan porcentajes diferentes de cepas de *S. aureus* productoras de un solo tipo de enterotoxina (52%) y cepas con producción simultánea de enterotoxinas (48%). Sin embargo, el patrón de combinación de enterotoxinas observado en el presente estudio (SEB y SED) no coincide con los reportados por los autores mencionados. Además, Fueyo et al. (5), reportan cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* con patrones de coproducción (SEA + SEC y SEC + SED) diferentes al observado en esta investigación. Por otra parte, Boynukara et al. (16), al determinar la producción de enterotoxina en 55 cepas de *S. aureus*, no encontraron producción simultánea de 2 o más enterotoxinas en una misma cepa.

Al evaluar la relación entre la producción de enterotoxina y el origen de la cepa, se evidencia que el mayor porcentaje de aislamientos enterotoxigénicos provenía de diferentes tipos de secreciones (heridas, oculares y úlceras). Al aplicar el estadístico  $\chi^2$  se demostró una asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre la producción de enterotoxina y los aislamientos provenientes de muestras de secreciones. No obstante, otras investigaciones muestran una mayor prevalencia de cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas derivadas de muestras de sangre (15, 16).

Las variaciones en los resultados del presente estudio y las observadas en otras investigaciones sobre la ocurrencia de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus*, aisladas de muestras clínicas, pueden deberse a las variaciones geográficas y metodológicas. En las últimas décadas, Letertre et al. (22), describieron nuevos tipos de enterotoxinas (SEG-SEU), pero en este estudio no se investigó la presencia de estos tipos, ya que el equipo RPLA® no incluye antisueros para detectar estas nuevas enterotoxinas, sólo las clásicas SEA, SEB, SEC y SED.

Los biofilms son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son ubicuos en la naturaleza y responsables de una gran variedad de procesos infecciosos que responden escasamente a los tratamientos antimicrobianos (23). Mientras que, las infecciones agudas pueden ser eliminadas con un breve tratamiento antimicrobiano, las infecciones por biofilm, normalmente, no consiguen ser completamente eliminadas y producen episodios recurrentes, como consecuencia de que las bacterias del biofilm puede ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias creciendo en forma plactónica (24, 25).

Entre las enfermedades infecciosas en las cuales se ha logrado una asociación directa con la producción de biofilm se encuentran: otitis media, endocarditis, neumonía, periodontitis, caries dental, ostiomielitis e infecciones asociadas con dispositivos médicos, entre otros. Los principales microorganismos asociados con estos procesos incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, bacterias anaerobias como *Fusobacterium* y *Porphyromonas*, entre otras (23),

El Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos publicó recientemente que más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biofilms, de igual manera se les atribuye el 60% de las infecciones nosocomiales; incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad (26).

La escala colorimétrica propuesta por Arciola et al. (13) para caracterizar la producción fenotípica de biofilm en ARC mostró 30% de positividad para las cepas SARM estudiadas. Este resultado es comparable con lo reportado por Seza et al. (27), quienes al estudiar 129 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas informaron 22,5% de cepas productoras de biofilm. Otras investigaciones realizadas por Bose et al. (28), Diamond et al. (29) y Mathur et al. (30), en cepas de *Staphylococcus spp*, donde se determinó la capacidad adherente a través del método del ARC, informan porcentajes de positividad que oscilan entre 16-73%.

La evaluación de la capacidad de adherencia de las cepas estudiadas a través del método sobre placas de microtitulación, mostró diferentes grados de adhesión en el 98% de los aislamientos. No obstante, la literatura consultada indica que existe una gran variabilidad en la capacidad de adhesión de los aislamientos clínicos de *S. aureus*; de tal



modo que, los reportes de Smith et al. (31), Sánchez et al. (32), Bekir et al. (33); Rasha et al. (34) y Gamal et al. (35), indican porcentajes de adhesión en placas de microtitulación que oscilan entre 43-100%

En este estudio se observó una correlación de 30% en la producción de biofilm por los dos métodos fenotípicos, ARC y TPC. El estudio de Rasha et al. (34) muestra resultados similares al encontrar una correlación de 20% entre estos dos métodos. Una muy baja correspondencia entre ambos métodos (5,2%) fue demostrada por Marthur et al. (30). No obstante, una mejor correlación entre ambos métodos fue reportada Cafiso et al. (36), quienes reportaron que todos los *Staphylococcus* positivos por una prueba fueron también positivos por la otra.

Al comparar los métodos fenotípicos empleados en esta investigación para determinar la capacidad de las cepas de SARM para la formación de biofilm, el ARC, aunque es un método rápido y fácil de realizar tiene la desventaja de la subjetividad al observar los diferentes tipos de colonias que se desarrollan sobre este medio de cultivo; mientras que, el TPC sigue siendo una mejor opción para el estudio de producción de biofilm, tal como lo han sugerido otros autores (30, 34).

En conclusión, en las cepas estudiadas la capacidad de producción de enterotoxinas y la alta frecuencia de producción de biofilm, independientemente de su origen, llama la atención sobre el peligro potencial que representan, lo cual es más relevante tratándose de cepas resistentes a meticilina, puesto que estas cepas por si solas constituyen un problema de salud pública dada la dificultad que representa el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de microorganismo.

## Referencias bibliográficas

- (1) O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson D, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1379-1388.
- (2) Gordon J, Lowy D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46 (Suppl 5):350-359.
- (3) Bubeck J, Patel R, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* 2007; 75:1040-1044.
- (4) Dinges M, Orwin P, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(01):16-34.
- (5) Fueyo J, Martín M, González M, Mendoza M. Enterotoxins production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2001; 67:139-145.
- (6) Jørgensen, H., Mørk, T., Høgåsen, H., Rørvik, L. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol* 2005; 99:158-166.
- (7) Fueyo J. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo; 2005.
- (8) Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:207-228.

- (9) Vasudevan P, Venkitanarayanan K, Annamalai T, Mohan M. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003; 92:179-185.
- (10) Márquez S, Oliveira J, De Freitas L, Cássia B, Alves E, De Abreu R, et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol* 2007; 38:538-543.
- (11) Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42:872-874.
- (12) Christensen G, Simpson W, Younger J, Baddour L, Barrett F, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22:996-1006.
- (13) Arciola C, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolate genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 2002; 23:4233-4239.
- (14) Coia J, Browning L, Haines L, Birkbeck T, Platt D. Comparison of enterotoxins and haemolysins produced by methicillin-resistant (MRSA) and sensitive (MSSA) *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1992; 36:164-171.
- (15) Humphreys H, Keane C, Hones R, Pomeroyt H, Russellt R, Arbuthnott J, et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. *J Med Microbiol* 1989; 28:163-172.
- (16) Boynukara B, Gulhan T, Gurturk K, Alisarli M, Ogun E. Evolution of slime production by coagulase-negative staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens. *J Med Microbiol* 2007; 56:1296-1300.
- (17) Al Bustan M, Udo E, Chugh T. Nasal carriage of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* among restaurant workers in Kuwait City. *J. Epidemiol Infect* 1996; 116(03):319-322.
- (18) Mehrotra M, Wang G, Johnson W. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microb* 2000; 38:1032-1035.
- (19) Rall L, Sforzin J, Augustini C, Watanabe M, Fernandes A, Rall R, et al. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus sp* isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Braz J Microbiol* 2010; 41: 59-65.
- (20) Sila J, Sauer P, Kolar M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and *tsst-1* between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the University Hospital in Olomouc. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009; 153(3):215-218.
- (21) Avani V, Mediavilla J, Robiou N, Guh A, Wang X, Gialanella P, et al. Diverse Enterotoxin Gene Profiles among Clonal Complexes of *Staphylococcus aureus* Isolates from the Bronx, New York. *Appl Environ Microb* 2009; 75(21):6839-6849.
- (22) Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of

- Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol 2003; 95:38-43.
- (23) Castrillón L, Palma A, Padilla M. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. Dermatología Rev Mex 2010; 54(1): 14-24.
- (24) Wilson M. Bacterial biofilm and human disease. Sci Prog 2001; 84:235-254.
- (25) Donlan R, Costerton J. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167-193.
- (26) Herrera M, El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. Nova Publicación Científica 2004; 2: 71-.
- (27) Seza A, Özkardes F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2007; 102(1):29-33.
- (28) Bose S, Khodke M, Basak S, Mallick S. Detection Of Biofilm Producing Staphylococci: Need Of The Hour. J Clin Diagn Res 2009; (3):1915-1920.
- (29) Diamond B, Solórzano F, Leños B, Peregrino L, Miranda G. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. BMC Infectious Diseases 2010; 10(68): 1471-2334.
- (30) Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006; 24 (1):25-29.
- (31) Smith K, Pérez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell C, Lang S. 2008. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 2008; 57:1018-1023.
- (32) Sánchez J, Mende K, Beckius M, Akers S, Romano R, Wenke C, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infectious Diseases 2013; 13(47):1-12.
- (33) Bekir K, Haddad O, Grissa M, Chaieb K, Bakhrouf A, Ibrahim Elgarssdi S. Molecular detection of adhesins genes and biofilm formation in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Afr J Microbiol Res 2012; 6 (23):4908-4917.
- (34) Rasha N, Hala A, Hussein H. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics 2012; 13:269-274.
- (35) Gamal Mahmoud, El-Feky M, El-Rehewy M, Hassan M, Abolella H, Abd El-Baky R. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries 2009; 3(5):342-351.
- (36) Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli M, et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. Clin Microbiol Infect 2004; 10:1081-1088.