



Relación genética, formación de biopelículas, movilidad y virulencia de *Escherichia coli* aislada de mastitis bovina



Alejandro Sergio Cruz-Soto ^a

Valentín Toro-Castillo ^a

Cristián Omar Munguía-Magdaleno ^a

José Emmanuel Torres-Flores ^a

Luis Enrique Flores-Pantoja ^a

Pedro Damián Loeza-Lara ^a

Rafael Jiménez-Mejía ^{a*}

^a Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. Genómica Alimentaria. Avenida Universidad No. 3000. Col. Lomas de la Universidad, 59103, Sahuayo, Michoacán, México.

*Autor de correspondencia: rjimenez@ucienegam.edu.mx

Resumen:

Escherichia coli es una de las bacterias ambientales que frecuentemente se ha visto implicada en infecciones de la glándula mamaria bovina. Aunque se desconocen los factores de virulencia específicos involucrados en dicho proceso, se ha observado que las bacterias formadoras de biopelículas se asocian con infecciones persistentes. De igual forma se ha planteado que las bacterias móviles pueden ser más patógenas. El propósito del trabajo fue analizar la relación genética, capacidad de formación de biopelículas y movilidad de *E. coli* aislada de casos de mastitis bovina, así como la virulencia *in vivo* de aislados representativos. El 67.7 % de las bacterias pertenece al grupo filogenético A, el 17.6 % al grupo B1 y el 14.7 % al D. El estudio de la relación genética mediante (GTG)₅ reveló que solo dos bacterias son idénticas genéticamente, el resto se organizaron en siete grupos distintos con 70 % de

similitud. El 76.5 % de las bacterias fue capaz de formar biopelículas de forma fuerte, moderada o débil. Además, los genes *csgA* y *fimA* se detectaron en el 52.9 % de las bacterias formadoras de biopelículas. El análisis de movilidad mostró que el 70.6 % fue móvil. Mientras que, el análisis de patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella* reveló que bacterias formadoras de películas y móviles fueron capaces de matar un mayor número de larvas a las 24 h que las no formadoras. Los resultados indican que las *E. coli* causantes de mastitis bovina son muy diversas y pertenecen principalmente al grupo filogenético A y que las formadoras de biopelículas y móviles son más patógenas.

Palabras clave: *E. coli*, Mastitis bovina, Diversidad, Biopelículas, Virulencia.

Recibido: 24/07/2018

Aceptado: 16/01/2019

Introducción

La mastitis bovina es la principal causa de pérdidas económicas a nivel mundial debido a la disminución en la producción de leche, costos de tratamiento, descarte temprano de ganado, entre otros⁽¹⁾. Uno de los principales patógenos ambientales causante de mastitis bovina es *E. coli*, cuyas infecciones pueden ser desde moderadas hasta severas^(2,3). Aunque a la fecha no se han logrado determinar los factores de virulencia específicos de las *E. coli* asociadas a mastitis bovina, se ha propuesto que éstas pueden formar parte de un nuevo patotipo denominado Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC)⁽⁴⁾. De acuerdo con esto último, estudios más recientes a nivel genómico han revelado la presencia de grupos de genes que codifican para sistemas de secreción tipo VI, biosíntesis de lipopolisacáridos, formación de biopelículas y sistemas de captación de hierro, característicos de las *E. coli* asociadas a mastitis bovina⁽⁵⁻⁸⁾. Sin embargo, otros autores sugieren que no hay evidencia suficiente de que las *E. coli* causantes de mastitis pertenecen a un patotipo particular⁽⁹⁾.

Diversos análisis filogenéticos de *E. coli* han permitido clasificarlas en cuatro grupos principales A, B1, B2 y D, en donde las bacterias comensales no patógenas pertenecen principalmente a los grupos A y B1, aunque estos filogrupos también incluyen patógenos importantes. Mientras al grupo B2 y en menor proporción al D, pertenecen las bacterias asociadas con infecciones extra-intestinales^(9,10). Para el caso de *E. coli* causantes de mastitis bovina se ha observado que pertenecen principalmente a los grupos filogenéticos A y B1^(11,12,13). Además, análisis genéticos y genómicos han revelado que las *E. coli* asociadas a mastitis bovina son muy diversas. En este sentido se ha reportado que las *E. coli* asociadas a mastitis bovina tanto persistente como transitoria, muestran diversidad fenotípica y

genotípica⁽¹⁴⁾. Asimismo, el análisis a nivel genómico de diversos aislados de *E. coli*, causantes de mastitis bovina y comensales, ha mostrado en ninguno de los casos las bacterias pueden clasificarse en un grupo filogenético en particular, sino que al parecer en ambos casos se han originado de diferentes linajes⁽⁹⁾.

La habilidad para colonizar e invadir el epitelio mamario bovino ayuda a las bacterias a evadir la respuesta inmune e infectar de forma persistente. En este sentido, se ha demostrado que *E. coli* causante de mastitis persistente invade células epiteliales mamarias en forma eficiente, aunque los mecanismos empleados para tal fin no se conocen con precisión, pero se observó que las bacterias que muestran mayor movilidad tienen mayor virulencia⁽¹⁵⁾. De igual forma, la matriz polimérica extracelular de las bacterias formadoras de biopelículas las hace más resistentes a diversas sustancias químicas con actividad antimicrobiana producidas por las células, además de que las protege del sistema inmune innato^(16,17).

Generalmente, para el estudio de la virulencia bacteriana se utilizan diversos modelos animales; sin embargo, muchos de esos modelos son costosos y presentan algunos problemas éticos. Por lo cual, en épocas recientes, uno de los modelos que ha tomado importancia son las larvas del insecto *Galleria mellonella*, en las que se ha analizado la virulencia de bacterias patógenas, tanto Gram positivas como negativas, así como hongos^(18,19). Por ejemplo, se ha observado que *G. mellonella* es un modelo adecuado para el estudio de variantes patógenas de *E. coli* tanto intestinales como extraintestinales^(20,21,22).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la diversidad genética, determinar los grupos filogenéticos, la capacidad de formación de biopelículas y movilidad de *E. coli* aisladas de casos de mastitis bovina subclínica, así como evaluar la virulencia de aislados representativos *in vivo* usando como modelo de estudio larvas de *G. mellonella*.

Material y métodos

Preparación de extractos de ADN y determinación del grupo filogenético

Se estudiaron 34 *E. coli* resistentes a antibióticos, que fueron aisladas de casos de mastitis bovina subclínica en el occidente del estado de Michoacán, México, y las cuales fueron descritas previamente⁽²³⁾. A partir de estos aislados se prepararon extractos totales de ADN de acuerdo a lo descrito en la literatura⁽²⁴⁾. Para la determinación del grupo filogenético al que pertenecen las *E. coli* se siguió el esquema descrito en la literatura⁽¹⁰⁾. Los primers utilizados para la amplificación de los fragmentos fueron: ChuA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3') y ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'), YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3') y YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3') y TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3') y TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-

3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 μ l conteniendo: 1X PCR Master mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 μ M de cada primer y 2 μ l de extracto de ADN bacteriano (50 ng). La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad, México, DF, México) en las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos en las siguientes condiciones; desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. La amplificación se terminó con un ciclo de extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5 % y se visualizaron en un fotodocumentador Universal Hood II (Bio-Rad).

Producción de biopelículas

La producción de biopelículas se realizó de acuerdo a la literatura⁽²⁵⁾ con algunas modificaciones como se describe a continuación. Las bacterias se sembraron en cajas Petri con agar soya tripticasa (AST, BD, México, DF, México), a partir de dichos cultivos se inocularon tubos con 2 ml de caldo soya tripticasa (CST) adicionado de 0.25 % de glucosa, se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación constante. Al día siguiente los cultivos se diluyeron hasta igualar con el tubo 0.5 de la escala de MacFarland en TSB con 0.25 % de glucosa. De la dilución bacteriana se depositaron 200 μ l por triplicado en placas de Elisa de 96 pozos y se crecieron por 24 h a 37 °C sin agitación. Como control negativo se usó medio de cultivo sin inocular y como control positivo se utilizó la bacteria formadora de biopelículas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se descartó el cultivo bacteriano y los pozos de la placa se lavaron tres veces con solución salina estéril, para la fijación de las células la placa se dejó secar a 60 °C por 1 h. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de cristal violeta al 1% y se dejó a temperatura ambiente por 20 min, se lavó la placa con agua corriente hasta que no se observó desprendimiento de color y se dejó secar a temperatura ambiente. A cada pozo de la placa se le adicionaron 200 μ l de etanol al 96%, se agitó para solubilizar el cristal violeta, el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se repitió el proceso, el volumen del tubo se llevó a 1 ml y se midió la densidad óptica a 570 nm (D.O.) en un espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio-Rad). El ensayo se repitió cuatro veces por triplicado y con los datos obtenidos se calculó el promedio de la D.O. De igual forma se calculó la densidad óptica de corte (D.O.c.), para lo cual se tomó como base el promedio de la D.O. del control negativo más tres veces su desviación estándar, obteniéndose un valor de 0.22. La clasificación de las bacterias formadoras de biopelículas se realizó como sigue: formadoras fuertes $D.O. > 4 \times D.O.c.$, moderadas $2 \times D.O.c. < D.O. \leq 4 \times D.O.c.$, débiles $D.O.c. < D.O. \leq 2 \times D.O.c.$ y negativas $D.O. \leq D.O.c.$ ⁽²⁵⁾.

DetECCIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se analizó mediante PCR la presencia de dos genes asociados con la formación de biopelículas, *fimA* (subunidad principal de la fimbria tipo I) y *csgA* (subunidad principal de la fimbria curli). Para lo cual se amplificó un fragmento de 119 pb de *fimA* con *fimA-F* (5'-CTCTGGCAATCGTTGTTCTGTCG-3') y *fimA-R* (5'-GCAAGCGGCGTTAACAACCTCC-3') y de 178 pb de *csgA* con *csgA-F* (5'-GATCTGACCCAACGTGGCTTCG-3') y *csgA-R* (5'-GATGAGCGGTCGCGTTGTACC-3')⁽²⁶⁾. Las reacciones se realizaron en 25 µl conteniendo 1X PCR Master mix (Promega), 1 µM de cada primer, 2 µl de extracto total de ADN. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, las reacciones se terminaron con un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron como se describió anteriormente.

Determinación de la movilidad tipo “swarming”

El análisis de movilidad bacteriana se realizó siguiendo el protocolo ya descrito⁽¹⁵⁾. Para la movilidad tipo swarming los cultivos se crecieron toda la noche en caldo LB (Lysogeny Broth). Posteriormente se depositaron 5 µl en placas con agar swarming (LB con agar al 0.5%) adicionado con 0.5 % de glucosa. Las bacterias se incubaron por 12 h a 37 °C. Posteriormente se midió el diámetro del desplazamiento bacteriano, las determinaciones se repitieron al menos tres veces y con los datos obtenidos se calculó el promedio.

Rep-PCR de *E. coli* causante de mastitis bovina

Para el análisis de la diversidad genética se purificó ADN genómico de acuerdo a protocolos estándar⁽²⁷⁾, con el DNA purificado se realizaron amplificaciones por PCR en 25 µl de mezcla de reacción con los siguientes componentes: 12.5 µl de 2X Master mix (Promega), 3 mM de MgCl₂, 5% de DMSO, 0.16 µg/µl de albumina de suero bovino, 100 ng de ADN y 2 µM del primer (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). La amplificación se realizó en un termociclador C-1000 (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos a las siguientes condiciones; desnaturalización (94 °C/3 s y 92 °C/30 s), alineamiento (40 °C/1 min), extensión (65 °C/8 min) y se finalizó con un ciclo de extensión a 65 °C durante 8 min⁽²⁸⁾. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron en un fotodocumentador Universal Hood II (Bio-Rad).

Para el análisis de los patrones de bandas obtenidos se usó el software GelJ versión 2⁽²⁹⁾. El tamaño de las bandas fue normalizado usando como estándar de referencia el marcador 1 kb

DNA ladder (Promega), que tiene fragmentos entre 250 y 10,000 pb. Los coeficientes de similitud fueron generados por el método de Dice con 2 % de tolerancia entre los carriles y el dendrograma se construyó usando el método UPGMA.

Virulencia en *Galleria mellonella*

Se analizó la virulencia *in vivo* de bacterias representativas que mostraron los mayores índices de formación de biopelículas, así como no formadoras en larvas de *G. mellonella*; para lo cual, se utilizaron larvas de 150 a 200 mg, libres de daño aparente y sin melanización (manchas necróticas) (Petmmal, Cuautitlán Izcalli, México). Las larvas se almacenaron en a 30 °C en obscuridad hasta su uso. Para los ensayos de infección se utilizaron cultivos bacterianos crecidos en caldo LB hasta la fase exponencial media de crecimiento (D.O. 600 nm= 0.5), se centrifugaron a 12,000 rpm/min, se lavaron dos veces con 1 ml de MgSO₄ 10 mM, al final las bacterias se re-suspendieron en 1 ml de MgSO₄ 10 mM. A partir de esta suspensión celular, se realizaron diluciones seriales hasta obtener una concentración bacteriana de aproximadamente 1x10⁵ UFC/ml, lo cual fue confirmado mediante el conteo de UFC en agar LB.

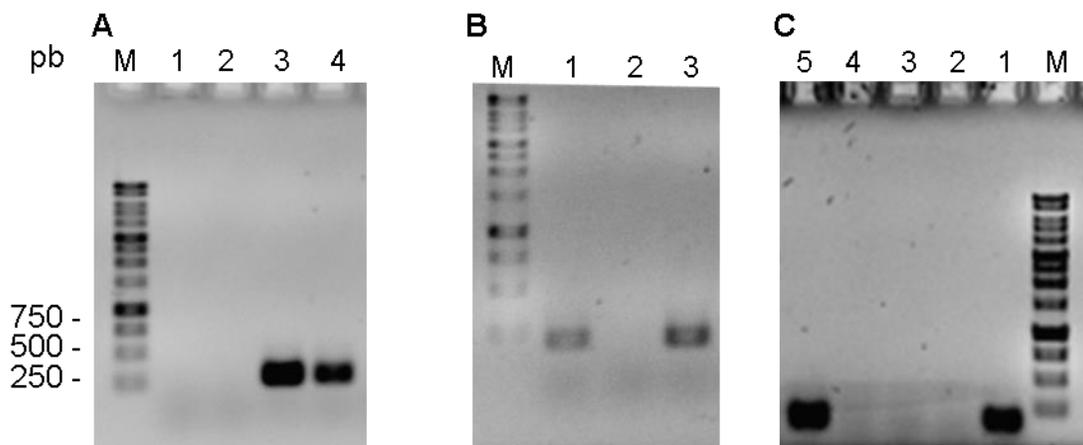
Para cada una de las bacterias a estudiar se utilizaron 10 larvas de *G. mellonella*, a las cuales se les inyectaron 10 µl de la suspensión bacteriana (1 x 10⁵ UFC/ml) en la última pro-pierna, con una jeringa de insulina con aguja calibre 29G. Como controles negativos se inyectaron 10 larvas con MgSO₄ 10 mM sin bacterias y 10 más sin inocular. Las larvas, tanto inoculadas como no inoculadas se colocaron en cajas Petri estériles y se incubaron a 30 °C en obscuridad por 96 h. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia a las 24, 48, 72 y 96 h, se registraron como muertas aquellas larvas que no respondieron al tacto⁽²¹⁾. Los ensayos de infección con cada bacteria se repitieron al menos dos veces de forma independiente.

Resultados

Grupos filogenéticos y relación genética de *E. coli* asociada a mastitis bovina

De acuerdo a los resultados obtenidos de la amplificación de los fragmentos *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) y TspE4.C2 (152 pb) (Figura 1), las 34 *E. coli* asociadas a mastitis bovina se clasificaron en tres grupos filogenéticos. El 67.7 % (23 aislados) pertenece al grupo A, el 17.6 % corresponde al grupo B1 (6 aislado) y el restante 14.7 % (5 aislados) corresponde al D (Figura 2B).

Figura 1: Geles de agarosa de los resultados positivos y negativos representativos de la amplificación por PCR de: A) *chuA* (279 pb), B) *yjaA* (211 pb) y, C) TspE.C2 (152 pb)



El análisis de relación genética mediante rep-PCR con el oligonucleótido (GTG)₅ arrojó 32 patrones distintos de entre 7 y 21 bandas, con tamaños que oscilaron de 250 a 5,000 pb (Figura 2). El dendrograma generado a partir de los patrones de bandas usando el coeficiente de similitud de Dice por el método de UPGMA, indica que la similitud más baja entre los aislados fue de 58 %, mientras que la mayor similitud observada fue del 100 % en dos aislados. También se puede apreciar que considerando una similitud genética del 70 % (línea punteada) se identificaron 7 grupos de bacterias, de los cuales el grupo VII fue el más grande con 22 (64.7 %) aislados, el grupo III con 4 (11.8 %), el grupo VI con 3 (8.8 %) bacterias, el grupo I con 2 (5.8 %) y los grupos II, IV y V con un solo aislado (2.9 %), respectivamente (Figura 3).

Figura 2: Gel de agarosa de la separación de los productos amplificados por (GTG)₅-PCR, se indica el tamaño en pares de bases de algunas bandas del marcador de 1 kb

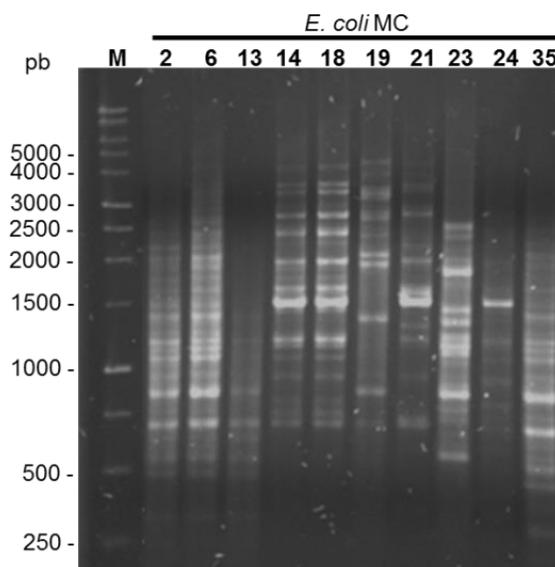
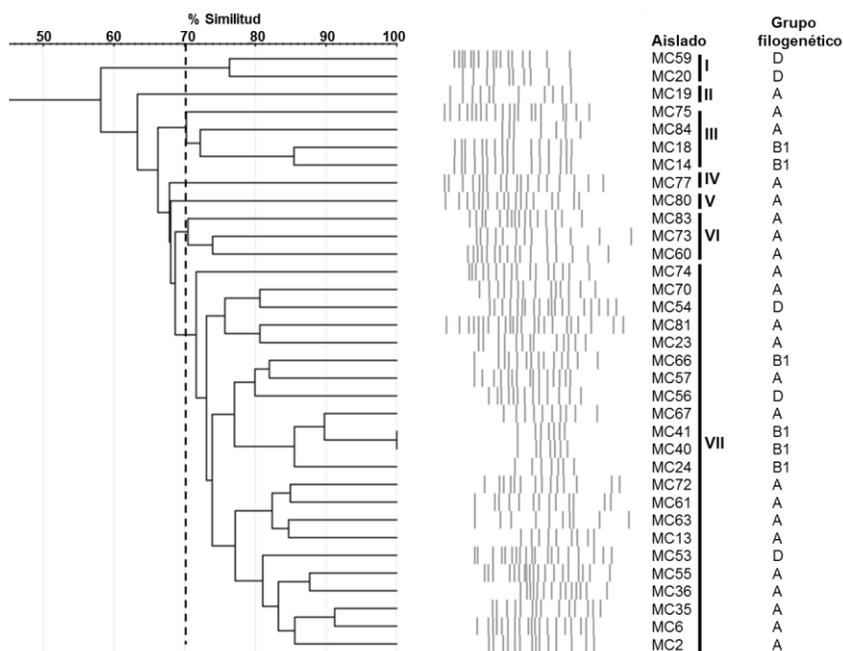


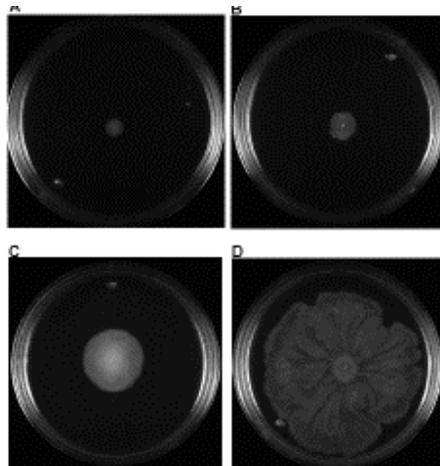
Figura 3: Agrupamiento de los patrones de bandas obtenidos en 34 *E. coli* asociadas a mastitis bovina, basado en el coeficiente de similitud de Dice generado mediante UPGMA



Movilidad, formación de biopelículas y detección de genes asociados

El análisis de la movilidad de las 34 *E. coli*, reveló que 10 no fueron móviles (-) y 24 mostraron movilidad. De éstas últimas de acuerdo al diámetro del desplazamiento 12 se consideraron poco móviles (+), 6 con movimiento moderado (++) y 6 fueron muy móviles (+++) (Figura 4 y Cuadro 1).

Figura 4: Resultados representativos de movilidad tipo "swarming". A) No móvil, B) Poco móvil, C) Moderadamente móvil, D) Muy móvil



Cuadro 1: Movilidad, formación de biopelículas y frecuencia de genes asociados a la formación de biopelículas de 34 aislados de *E. coli* provenientes de casos de mastitis bovina subclínica

<i>E. coli</i>	Movilidad ^a	Biopelícula ^b	Genotipo <i>csgA/fimA</i>
MC75	+++	D	+/+
MC80	+	N	+/+
MC81	+	D	+/+
MC83	+	N	+/+
MC13	-	F	-/-
MC14	-	D	+/+
MC72	+++	M	+/+
MC19	++	F	-/+
MC40	+++	D	+/+
MC41	+	N	+/+
MC59	-	D	-/-
MC73	+	M	-/-
MC66	-	D	+/+
MC2	-	F	-/-
MC6	+	F	-/-
MC35	++	F	-/+
MC36	+	F	-/+
MC84	-	D	-/-
MC24	+	D	+/+
MC56	++	D	+/+
MC67	-	N	+/+
MC74	++	M	-/-
MC77	++	N	-/-
MC55	+	F	-/-
MC60	+	D	-/-
MC54	+++	M	+/+
MC18	+	D	+/+
MC23	-	M	-/+
MC57	-	M	-/-
MC53	+++	N	+/+
MC20	+	N	+/+
MC70	+++	D	+/+
MC61	++	N	+/+
MC63	-	M	-/-

^a(-) no móvil, (+) poco móvil, (++) moderadamente móvil, (+++) muy móvil.

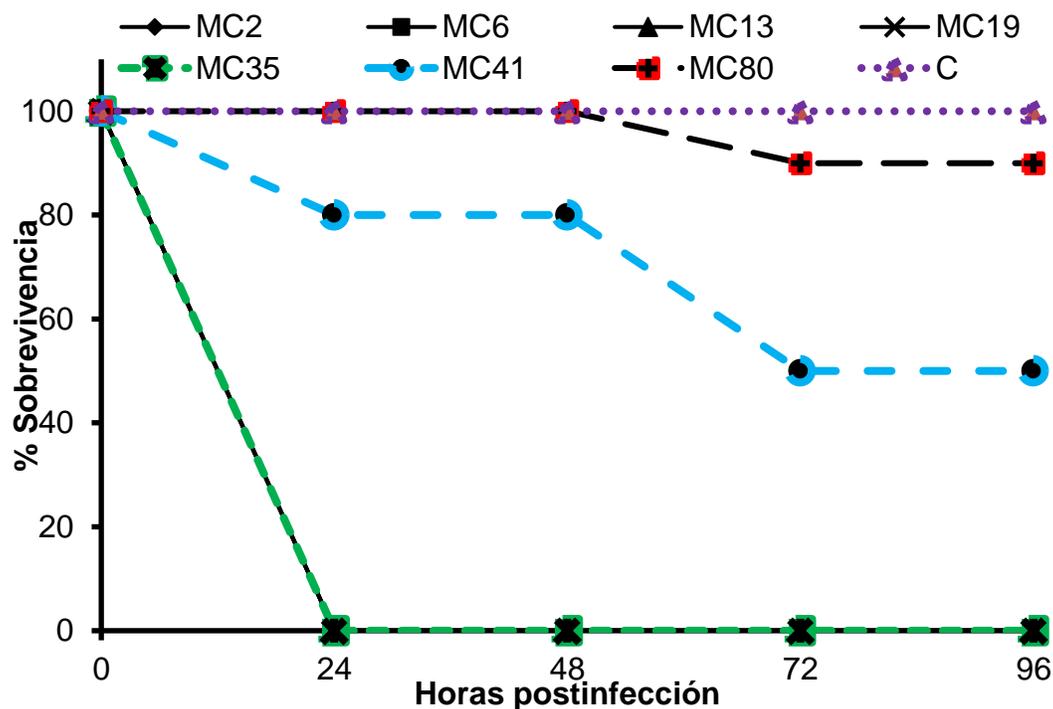
^bN, negativo; D, débil; M, moderado; F, fuerte.

Para la formación de biopelículas 26 aislados (76.5 %) formaron biopelículas en algún grado (D.O. >0.22) y las restantes 8 (23.5 %) no fueron formadoras (D.O. ≤ 0.22). Para el caso de las formadoras, siete se clasificaron como formadoras fuertes (D.O. >0.88) y moderadas (D.O. 0.45-0.88), mientras que 12 mostraron capacidad de formación débil (D.O. 0.23-0.44) (Cuadro 1). En 22 (64.7 %) de las 34 *E. coli* se detectó la presencia de alguno de los dos genes *csgA/fimA*, mientras que de las 26 formadoras en 15 se detectó uno o los dos genes. También los genes *csgA* y *fimA* se observaron en siete aislados no formadores de biopelículas.

Virulencia de *E. coli* en *G. mellonella*

Con el propósito de analizar si hay diferencias en la patogénesis de los aislados de *E. coli* asociadas a mastitis bovina se realizaron ensayos de infección en larvas de *G. mellonella* con siete aislados representativos, cinco formadores fuertes de biopelículas y dos no formadores. Como se observa en la Figura 5, las bacterias formadoras de biopelículas mataron el 100 % de las *G. mellonella* a las 24 h después de la infección; mientras que, con los dos aislados no formadores de biopelículas se observó una mortalidad de entre 0 y 20 % a las 24 h y de 10 y 50 % a las 96 h. Para el caso del control no se observaron decesos durante las 96 h que duró el experimento.

Figura 5: Virulencia en *G. mellonella* de siete aislados representativos de *E. coli*, los formadores de biopelículas fueron MC2, 6, 13, 19 y 35. MC41 y MC80 no fueron formadores de biopelículas. También se muestra el control negativo (C)



Discusión

La mastitis bovina causada por *E. coli* es una infección que puede ser desde leve hasta severa, aunque a la fecha no se han asociado factores de virulencia específicos a dichas bacterias causantes de la enfermedad^(11,30), incluso se ha sugerido que la severidad de la infección está determinada por las características del ganado más que por los microorganismos⁽³¹⁾. Además, una línea de evidencia ha sugerido que las infecciones mamarias pueden ser producidas por cualquier cepa de *E. coli*⁽¹¹⁾, mientras que otra ha mostrado que no todos los aislados de *E. coli* son capaces de producir mastitis en modelos animales⁽⁵⁾.

Por otro lado, se ha observado que las *E. coli* causantes de mastitis bovina pertenecen principalmente al grupo filogenético A, B1 y en menor proporción al grupo D⁽⁷⁾. De acuerdo con los reportes previos, en este trabajo se encontró que el 67.6 % de las *E. coli* analizadas pertenecen al grupo filogenéticos A, 17.6 % al B1 y 14.7 % al grupo D. En este mismo sentido, en un estudio se observó que el 50 % de las *E. coli* asociadas tanto a mastitis persistente como transitoria pertenecen al filogrupo A, 28.6 % al B1 y 7.1 % al grupo B2 y D, respectivamente⁽¹⁴⁾. Otros autores han descrito que el 44.88 % de las *E. coli* asociadas a mastitis pertenecen al filogrupo A, 38.58 % al B1 y 16.53 % al D⁽³²⁾. Resultados similares también han sido reportados en otros trabajos^(13,33). Además, se ha observado que las *E. coli* aisladas de mastitis bovina presentan gran diversidad en serotipos, tipo de enfermedad (transitoria o persistente) y genotipo, incluso aunque pertenezcan a un mismo grupo filogenético determinado^(3,34). En este sentido, las 34 *E. coli* analizadas en este trabajo presentaron gran diversidad genética, solo dos de ellas mostraron patrones de bandas idénticos, las restantes presentaron similitud entre el 92 y 58 %. Los resultados obtenidos también indican que no hay una separación clara entre los diferentes filogrupos, lo cual indica una gran heterogeneidad entre las *E. coli* causantes de mastitis bovina en nuestra área de estudio. Otros autores también han observado gran diversidad genética en *E. coli* causantes de mastitis bovina^(3,30,34,35).

La habilidad de formar biopelículas en bacterias patógenas les confiere protección contra el sistema inmune del hospedero y resistencia a antibióticos, además de ser importante para la virulencia⁽²⁶⁾. En este sentido, se ha observado que las bacterias asociadas a mastitis bovina muestran un patrón variable en la formación de biopelículas⁽³⁶⁾. Aunque en las infecciones recurrentes se ha asociado a aquellas bacterias con la capacidad de formación de biopelículas⁽¹⁶⁾. Los resultados descritos en este trabajo muestran que 20.6 % de los aislados pueden formar biopelículas de forma fuerte y moderada, mientras que 35.3 % lo hace de forma débil. De forma similar en otros estudios se ha observado que *E. coli* asociadas a mastitis bovina son capaces de formar biopelículas de forma variable, donde 18.5 % lo hace de forma fuerte, 40.7 % moderada y débil⁽³⁶⁾. En otro estudio se describió que 40 % de las *E.*

coli asociadas a mastitis bovina fue formador fuerte de biopelículas, 12 y 4 % lo hicieron de forma moderada y débil, respectivamente⁽³³⁾.

De las 34 *E. coli* analizadas, en el 52.9 % se detectó la presencia de los genes *csgA* y *fimA*, en el 11.8 % solo se detectó *fimA* y en el restante 35.3 % no se detectó ninguno de los dos. En 15 de las 26 *E. coli* formadoras de biopelículas se detectó la presencia de al menos uno de los genes, mientras que en siete no formadores se detectó al menos uno de los dos genes. En este sentido, ambos genes se han asociado a la formación de biopelículas, al igual que otra variedad de genes y condiciones ambientales⁽³⁷⁾. Por lo cual, se requieren más estudios para caracterizar con más detalle los factores que afectan o promueven la formación de biopelículas en nuestra colección bacteriana. Por otro lado, se ha descrito que la formación de biopelículas varía dependiendo de la cepa, medio de cultivo, metodología y método de cuantificación. En este estudio solo se probó un medio de cultivo y una temperatura, por lo que pudiera ser que en otras condiciones las bacterias no formadoras de biopelículas y positivas para los genes *csgA* y *fimA* sean capaces de formar biopelículas⁽³⁸⁾.

Otro factor importante para que las bacterias se diseminen y produzcan infecciones persistentes en el ganado es la movilidad⁽¹⁵⁾. De acuerdo con lo anterior se encontró que 70.6 % de las *E. coli* estudiadas fueron móviles, esto sugiere que en nuestra colección tenemos bacterias tanto de mastitis persistente como transitoria. Además, los resultados obtenidos *in vivo* indican que las bacterias formadoras de biopelículas mostraron mayor virulencia contra las larvas de *G. mellonella* en comparación con las no formadoras. Aunque se requiere más trabajo para establecer la correlación entre la patogénesis *in vivo* en *G. mellonella* con la severidad de la enfermedad causada por *E. coli*. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que este organismo puede ser un modelo adecuado para analizar la patogénesis de las *E. coli* causantes de mastitis.

Conclusiones e implicaciones

Los resultados presentados en este trabajo indican que las *E. coli* asociadas a mastitis bovina en nuestra área de estudio son muy diversas tanto a nivel genético como fisiológico. Y que las bacterias que tienen la habilidad para formar biopelículas de forma fuerte son más patógenas que las no formadoras. La diversidad genética y fenotípica de las bacterias estudiadas indica que no hay cepa, genotipo o factor de virulencia específico asociado a la enfermedad. Sin embargo, debido a que las bacterias formadoras de biopelículas se han asociado con infecciones mamarias recurrentes y persistentes, es importante estudiar mejores estrategias para el control de las infecciones causadas por esas bacterias. Lo cual podría disminuir las pérdidas económicas asociadas con la reducción en la producción y calidad de la leche.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por PRODEP (IDCA-11106) y por la UCEMICH (proyectos UCEMICH-2016-006 y UCEMICH-2017-004). Los autores agradecen al Dr. Iván Medina y al Dr. José Antonio Aguilar por su valiosa ayuda en la revisión del manuscrito.

Literatura citada:

1. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Q* 2007;29(1):18-31.
2. Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci* 2006;89(9):3408-3412.
3. Hagiwara S, Mori K, Okada H, Oikawa S, Nagahata H. Acute *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: diagnostic parameters associated with poor prognosis. *J Vet Med Sci* 2014;76(11):1431-1436.
4. Shpigel NY, Elazar S, Rosenshine I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(1):60-65.
5. Blum SE, Heller ED, Sela S, Elad D, Edery N, Leitner G. Genomic and phenomic study of mammary pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 2015;10(9):e0136387.
6. Kempf F, Slugocki C, Blum SE, Leitner G, Germon P. Genomic comparative study of bovine mastitis *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 2016;11(1):e0147954.
7. Goldstone RJ, Harris S, Smith DG. Genomic content typifying a prevalent clade of bovine mastitis-associated *Escherichia coli*. *Sci Rep* 2016;(6):30115.
8. Olson MA, Siebach TW, Griffiths JS, Wilson E, Erickson DL. Genome-wide identification of fitness factors in mastitis-associated *Escherichia coli*. *Applied Environ Microbiol* 2018;84(2):e02190-17.
9. Leimbach A, Poehlein A, Vollmers J, Görlich D, Daniel R, Dobrindt U. No evidence for a bovine mastitis *Escherichia coli* pathotype. *BMC Genomics* 2017;18(1):359.
10. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(10):4555-4558.
11. Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, Myllyniemi AL, Pitkälä A, Pelkonen S, Pyörälä S. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet Microbiol* 2011;147(3-4):383-388.

12. Liu Y, Liu G, Liu W, Liu Y, Ali T, Chen W, Yin J, Han B. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. Res Microbiol 2014;165(4):273-277.
13. Keane OM. Genetic diversity, the virulence gene profile and antimicrobial resistance of clinical mastitis-associated *Escherichia coli*. Res Microbiol 2016;167(8):678-684.
14. Dogan B, Rishniw M, Bruant G, Harel J, Schukken YH, Simpson KW. Phylogroup and *lpfA* influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. Vet Microbiol 2012;159(1-2):163-170.
15. Lippolis JD, Brunelle BW, Reinhardt TA, Sacco RE, Nonnecke BJ, Dogan B, Simpson K, Schukken YH. Proteomic analysis reveals protein expression differences in *Escherichia coli* strains associated with persistent versus transient mastitis. J Proteomics 2014;(108):373-381.
16. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. Vet J 2006;171(3):398-407.
17. Atulya M, Mathew AJ, Rao JV, Rao CM. Influence of milk components in establishing biofilm mediated bacterial mastitis infections in cattle: a fractional factorial approach. Res Vet Sci 2014;96(1):25-27.
18. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. J Vis Exp 2012;(70):e4392.
19. Nathan S. New to *Galleria mellonella*: modeling an ExPEC infection. Virulence 2014;5(3):371-374.
20. Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA Upton M. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. PLoS ONE 2014;9(7):e101547.
21. Morgan JK, Ortiz JA, Riordan JT. The role for TolA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and virulence gene transcription. Microb Pathog 2014;(77):42-52.
22. Ciesielczuk H, Betts J, Phee L, Doumith M, Hope R, Woodford N, Wareham DW. Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. Virulence 2015;6(2):145-151.
23. Jiménez-Mejía R, Gudiño-Sosa LF, Aguilar-López JA, Loeza-Lara PD. Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. Rev Mex Cienc Pecu 2017;8(4):387-396.

24. Madico G, Akopyants NS, Berg DE. Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157: H7 strains by using templates from boiled cultures. *J Clin Microbiol* 1995;33(6):1534-1536.
25. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;115(8):891-899.
26. Silva VO, Soares LO, Júnior AS, Mantovani HC, ChangYF, Moreira MAS. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(19):6136-6145.
27. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* 2001;56(1):241-245.
28. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiol Lett* 2007;277(1):98-106.
29. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics* 2015;(16):270.
30. Blum SE, Leitner G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2013;163(3-4):305-312.
31. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003;34(5):521-564.
32. Ghanbarpour R, Oswald E. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Res Vet Sci* 2010;88(1):6-10.
33. Milanov D, Prunić B, Velhner M, Todorović D, Polaček V. Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of *Escherichia coli* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Acta Veterinaria* 2015;65(2):202-216.
34. Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP, Simpson K, Schukken YH. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol* 2006;116(4):270-282.
35. Moser A, Stephan R, Corti S, Lehner A. Resistance profiles and genetic diversity of *Escherichia coli* strains isolated from acute bovine mastitis. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2013;155(6):351-357.

36. Fernandes JBC, Zanardo LG, Galvão NN, Carvalho IA, Nero LA, Moreira MAS. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. J Vet Diagn Invest 2011;23(6):1146-1152.
37. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol 2016;14(9):563-575.
38. Naves P, Del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodríguez-Cerrato V, Ponte MC, Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method- dependent. J Appl Microbiol 2008;105(2): 585-590.