



Relación entre la resistencia a antibióticos y la producción de biofilm de aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de mastitis bovina



Jaquelina Julia Guzmán-Rodríguez ^{a,b}

Estefanía Salinas-Pérez ^b

Fabiola León-Galván ^{a,c}

José Eleazar Barboza-Corona ^{a,c}

Mauricio Valencia-Posadas ^{a,b}

Fidel Ávila-Ramos ^{a,b}

José Antonio Hernández-Marín ^{a,b}

Diana Ramírez-Sáenz ^d

Abner Josué Gutiérrez-Chávez ^{a,b*}

^a Universidad de Guanajuato. Campus Irapuato-Salamanca. División de Ciencias de la Vida, Programa de Posgrado en Biociencias. Km. 9.0 Carr. Irapuato-Silao, El Copal, Irapuato, 36821, Guanajuato, México.

^b Universidad de Guanajuato. Campus Irapuato-Salamanca. División de Ciencias de la Vida, Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

^c Universidad de Guanajuato. Campus Irapuato-Salamanca. División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. México.

^d Consultoría en Biotecnología, Bioingeniería y Servicios Asociados, SA de CV. México.

*Autor de correspondencia: ajgutierrez@ugto.mx

Resumen:

El objetivo fue analizar la relación entre el perfil de resistencia a antibióticos y la formación de biofilm de aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina. Se analizaron 30 aislados

de *S. aureus* procedentes de casos de mastitis subclínica en granjas lecheras en sistemas de producción semi-intensivo y de traspatio ubicadas en los estados de Guanajuato y Michoacán, México. Se realizó un antibiograma por el método de difusión en disco Kirbi Bauer. La formación de biofilm se determinó por el método de tinción con cristal violeta. Para la evaluación de genes de resistencia a antibióticos y de formación de biofilm se obtuvo ADN genómico de una colonia para la identificación de los genes: *blaZ*, *mecA*, *tetK*, *tetM*, *gyrA* y *gyrB*, y *icaA* e *icaD*. Los resultados mostraron que el 100 % de los aislados fueron resistentes a penicilina y dicloxacilina, seguidos por cefotaxima (86.6 %), ampicilina y cefalotina (83.3 %) y ceftazidima (80.0 %), mientras que se observó un 36.6 % de resistencia a oxacilina. Se identificó que todos los aislados de *S. aureus* presentaron la capacidad de formar biofilm con un rango del 20 a 98 %. Se observó además que los aislados con una multiresistencia elevada presentaron una mayor formación de biofilm; estableciéndose una correlación positiva significativa. En conclusión, los aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina presentaron elevados niveles de resistencia a antibióticos; así como una importante capacidad formadora de biofilm, demostrando la existencia de una correlación positiva entre estos dos factores.

Palabras clave: Antibióticos, Mastitis, ADN, Biofilm.

Recibido: 20/03/2020

Aceptado: 12/03/2021

Introducción

El procesamiento de la leche bovina es un sector de suma importancia en la industria ganadera, en México, se estimó una producción superior a los 12 millones de toneladas en el 2019⁽¹⁾, lo que lo ubica dentro de los primeros diez países productores de leche a nivel mundial⁽¹⁾. Uno de los principales objetivos de una granja lechera debería ser tener una producción eficiente de leche y que ésta sea saludable y libre de contaminantes, por lo que es esencial que la glándula mamaria esté saludable⁽²⁾. En este sentido, la mastitis es la enfermedad más común y costosa en el ganado bovino lechero, ya que afecta el bienestar de la vaca y causa problemas económicos por pérdidas en producción, disminución de calidad y cantidad de leche, eliminación prematura de la vaca, costo de tratamiento veterinario y el descarte de la leche debido a la contaminación con antibiótico^(3,4).

Staphylococcus aureus es un patógeno ubicuo que causa una variedad de infecciones en humanos y animales y es uno de los principales agentes causales de la mastitis bovina^(5,6). Esta bacteria Grampositiva produce infecciones crónicas, persistentes y recurrentes, ya que es capaz de superar todas las barreras del sistema de defensa del huésped, debido a que posee un amplio espectro de factores de virulencia como la producción de enzimas, antígenos,

adhesinas y toxinas, entre otros⁽⁷⁾. Estos factores de virulencia eventualmente le confieren a la bacteria la multirresistencia a los antibióticos y la formación de biopelículas (“biofilm”)⁽⁸⁾. El biofilm es un consorcio de microorganismos que se encuentra embebido dentro de una matriz polimérica, constituida principalmente por exopolisacaridos, proteínas y ácidos nucleicos, que le permite a la bacteria adherirse a una superficie biótica o abiótica⁽⁹⁾. La formación de biofilm es una estrategia de vida para la mayoría de las bacterias, ya que ésta les brinda estabilidad, desempeña funciones catalíticas, aumenta las posibilidades de transferencia de material genético y la resistencia a los antibióticos, participa en los procesos de comunicación celular y ofrece protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del ambiente; lo que contribuye a su colonización exitosa en el hospedador⁽¹⁰⁾. La multirresistencia a antibióticos y la formación de biofilms son características de virulencia que se encuentran relacionadas entre sí de manera importante. En este sentido, se sabe que el biofilm formado por *S. aureus* aumenta significativamente la resistencia a los antibióticos, al inhibir la penetración del antimicrobiano lo que resulta en una situación cada vez más grave en el combate terapéutico de este microorganismo⁽¹¹⁾.

Actualmente nuestro grupo cuenta con una colección de aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina que fueron colectados en los estados de Guanajuato y Michoacán, México, los cuales han presentado niveles de multirresistencia a antibióticos muy elevados (70 a 100 %)⁽¹²⁾, lo que es congruente con la poca eficiencia en las terapias utilizadas en las unidades de producción de la región. Lamentablemente, en México hasta el momento no se ha evaluado la capacidad que tienen dichas bacterias causantes de mastitis bovina, para formar biofilms; y su posible relación con los niveles de resistencia a antibióticos. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue analizar si existe correlación entre el perfil de resistencia a antibióticos y la formación de biofilm de los aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina.

Material y métodos

Asilamiento de *S. aureus*

Se analizaron 30 aislados de *S. aureus* procedentes de casos de mastitis subclínica de vacas localizadas en granjas lecheras ubicadas en localidades de los estados de Guanajuato y Michoacán, México, las cuales utilizan sistemas de producción semi-intensivo y de traspatio. El muestreo, asilamiento y caracterización de los aislados ya fue reportado por Varela *et al* en 2018⁽¹²⁾.

Perfil de multirresistencia a antibióticos

Se realizó un antibiograma por el método de difusión en disco Kirbi Bauer⁽¹³⁾, utilizando sensidiscos de la marca Biorad[®] con los siguientes antibióticos y concentraciones: penicilina (PE) 6 µg, oxacilina (Oxa) 6 µg, dicloxacilina (DC) 30 µg, pefloxacina (PEF) 5 µg, cefuroxima (CXM) 30 µg, gentamicina (GE) 120 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, sulfametoxazol + trimetoprima (SXT) 1.25 y 23,75 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, ampicilina (AM) 10 µg, eritromicina (E) 15 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg y cefalotina (CF) 30 µg. Los resultados se reportan como sensible, intermedio y resistente con base en los parámetros establecidos en Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019⁽¹⁴⁾. Una vez establecido el perfil de resistencia, los 30 aislados se clasificaron como se describe a continuación: Grupo 1: Resistencia alta (resistentes a 11-13 antibióticos), Grupo 2: Resistencia media (9-10 antibióticos), Grupo 3: Resistencia baja (4-8 antibióticos).

Formación de biofilm

Para medir la capacidad formadora de biofilm de los aislados de *S. aureus*, se utilizó el protocolo de tinción con cristal violeta⁽¹¹⁾, como se describe a continuación: se cultivó el aislado bacteriano en medio LB y se incubó 24 h a 37 °C. Los ensayos se realizaron en placas estériles de 96 pozos y se colocaron $\approx 1 \times 10^6$ UFC en un volumen final de 100 µl en cada pozo. Los aislados se incubaron 48 horas a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante, se lavaron los pozos con 100 µl de solución PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄) y se secaron los pozos. Posteriormente, a cada pozo se adicionaron 100 µl de solución de cristal violeta (0.5% peso/volumen) y se dejó reposar 15 min. Después se eliminó el colorante y se lavó dos veces con 100 µl de PBS. Después se adicionaron 125 µl de etanol al 95% (volumen/volumen) y se resuspendió vigorosamente para disolver el colorante. Se tomó la lectura de la absorbancia a 495 nm en un analizador de microelisa ELIREAD (Kontrolab[®], Guidonia, Italia). Una vez obtenidos los datos, se graficó el porcentaje de formación de biofilm utilizando como 100 % la absorbancia registrada de la cepa certificada de *S. aureus* (ATCC 27543). Se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones.

Análisis de los genes de resistencia y formación de biofilm

La presencia de genes relacionados con la resistencia a antibióticos y formación de biofilm se realizó a partir del ADN genómico, el cual se obtuvo picando una colonia bacteriana de una placa de cultivo fresco, para posteriormente colocarla en la mezcla de reacción de PCR. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se muestran en el Cuadro 1. La reacción se

realizó en un volumen final de 20 µl que contenía oligonucleótidos 0.4 µM, desoxinucleótidos trifosfatos 200 µM (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), cloruro de magnesio 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 30 ciclos de amplificación de desnaturalización durante 10 min a 94 °C, alineamiento durante 1 min a la temperatura específica de los oligonucleótidos (Cuadro 1), polimerización durante 30 seg a 72 °C, y un ciclo de extensión final durante 7 min a 72 °C. Los amplicones (5 µl) se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (peso/volumen) y se tiñeron con bromuro de etidio. Se consideró positivo para el gen, la presencia de una banda de amplificación correspondiente al tamaño del producto esperado.

Cuadro 1: Oligonucleótidos (OLIG) utilizados

| OLIG | Secuencia | TA (°C) | TPE (pb) | Referencia |
|-------------|--|---------|----------|---|
| <i>blaZ</i> | 5'-TAAGAGATTTGCCTATGCTT-3' 5'-TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG-3' | 49 | 377 | Yang <i>et al.</i> , 2016 ⁽²⁹⁾ |
| <i>mecA</i> | 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATGA-3' 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3' | 62 | 310 | Elhassan <i>et al.</i> , 2015 ⁽²⁷⁾ |
| <i>tetK</i> | 5'-GTAGCGACAATAGGTAATAGT-3' 5'-GTAGTGACAATAAACCTCCTA-3' | 49 | 360 | Yang <i>et al.</i> , 2016 ⁽²⁹⁾ |
| <i>tetM</i> | 5'-AGTGGAGCGATTACAGAA-3' 5'-CATATGTCCTGGCGTGTCTA-3' | 49 | 158 | Yang <i>et al.</i> , 2016 ⁽²⁹⁾ |
| <i>gyrA</i> | 5'-AATGAACAAGGTATGACACC-3' 5'-ACGCGCTTCAGTATAACGC-3' | 49 | 222 | Hashem <i>et al.</i> , 2013 ⁽²⁸⁾ |
| <i>gyrB</i> | 5'-CAGCGTTAGATGTAGCAAGC-3' 5'-CCGATTCCTGTACCAAATGC-3' | 49 | 250 | Hashem <i>et al.</i> , 2013 ⁽²⁸⁾ |
| <i>icaA</i> | 5'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3' 5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3' | 50 | 1315 | Dhanawade, 2010 ⁽⁴⁹⁾ |
| <i>icaD</i> | 5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3' 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3' | 50 | 381 | Dhanawade, 2010 ⁽⁴⁹⁾ |
| <i>nuc</i> | 5'-GACTATTATTGGTTGATCCACCTG-3' 5'-GCCTTGACGAACTAAAGCTTCG-3' | 54 | 218 | Brakstad <i>et al.</i> , 2002 ⁽⁵⁰⁾ |

TA= temperatura de alineamiento; TPE= tamaño del producto esperado.

Para analizar el fundamento genético de los mecanismos de resistencia bacteriana, se analizó la presencia de los genes *blaZ* y *mecA* para los antibióticos betalactámicos^(15,16); *tetK* y *tetM* para tetraciclinas⁽¹⁶⁾ y *gyrA* y *gyrB* para quinolonas⁽¹⁷⁾.

Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes en los cuales se midió la absorbancia producida por la tinción del biofilm formado. Los experimentos fueron hechos por triplicado. Se obtuvo la diferencia entre la mayor absorbancia, menos la mayor cantidad de biofilm, dicha diferencia definida en este estudio como absorbancia.

Los 30 aislados de *S. aureus* se clasificaron en tres grupos de acuerdo con el nivel de resistencia a antibióticos: alta, media y baja, de 10 aislados en cada uno y posteriormente fueron evaluados de acuerdo con su absorbancia. En los análisis se incluyeron los resultados de los controles positivos para cada nivel de resistencia de cada experimento.

Se evaluó la normalidad de la variable dependiente absorbancia, utilizando la prueba de bondad de ajuste de Ji cuadrada resultando normal ($P>0.05$). Los datos fueron analizados con un análisis de varianza (ANDEVA) con un diseño factorial con arreglo completamente al azar. El modelo utilizado se muestra a continuación:

$Y_{ijk} = \mu + EX_i + GR_j + EX_i \times GR_j + e_{ijk}$, en donde:

Y_{ijk} = es la k-ésima observación de absorbancia, del i-ésimo experimento y el j-ésimo grado de resistencia,

μ = media general como parámetro constante,

EX_i = i-ésimo experimento, $j=1, 2$ y 3 ,

GR_j = j-ésimo grado de resistencia, $i=1, 2$ y 3 ,

$GR_i \times EX_j$ = interacción entre el i-ésimo grado de resistencia y el j-ésimo experimento,

e_{ijk} = error experimental.

Adicionalmente, se estimó la correlación de rango de Spearman entre grado de resistencia y la absorbancia.

Resultados y discusión

Perfil de resistencia a antibióticos de los aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina

Los resultados muestran que el 100 % de los aislados son resistentes a la penicilina y dicloxacilina, además el 86.6, 83.3 y 80.0 % muestran resistencia a la ampicilina, cefalotina y ceftazidima, respectivamente; se observó también que un 36.6 % de los aislados son resistencia a la oxacilina. En general, todos los aislados analizados fueron resistentes al menos al 33.3 % de los antibióticos probados (Cuadro 2).

La resistencia a antibióticos es un fenómeno que sigue en aumento y que afecta de manera importante al sector salud, tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria, ya que dificulta el manejo adecuado de las enfermedades infecciosas. Tal es el caso de la mastitis bovina; *S. aureus*, como una de las principales bacterias aisladas de mastitis bovina presenta altos índices de resistencia. En los últimos años, a nivel mundial, continúa en aumento la selección de mecanismos de resistencia bacteriana⁽¹⁸⁾. En este sentido, en diversos países donde se analizó el perfil de resistencia de *S. aureus* proveniente de mastitis bovina, se encontraron porcentajes de resistencia a penicilina cercanos al 100 %⁽¹⁹⁻²³⁾, lo que coincide con los resultados aquí reportados. Con relación a la resistencia presentada a la oxacilina, se encontraron resultados contrastantes, ya que estudios realizados en países como la India y en China se presentaron niveles de resistencia del 48 al 84 %^(21,24,); sin embargo, en Alemania, Japón y Colombia los niveles de resistencia a oxacilina son mínimos (2-7 %)^(21,23,25), mientras que estos resultados muestran niveles intermedios de resistencia (33.3 %). En México, estudios revelan elevados niveles de resistencia bacteriana a penicilina, amoxicilina y dicloxacilina (100 %)^(26,27), lo que es congruente con lo reportado en este trabajo. Asimismo, existe un incremento importante en la resistencia a la cefalotina, por ejemplo, en el 2008 se reportó que el 30 % de las cepas de *S. aureus* estudiadas presentaban resistencia⁽²⁷⁾; sin embargo, en este trabajo se encontró resistencia de hasta 83 %. Estas variaciones pueden deberse a la posible variabilidad genética de los aislados, a las diferencias climatológicas, así como discrepancias geográficas entre otros factores⁽²⁸⁾. Con base en estas diferencias, se resalta la necesidad de realizar trabajos como el que aquí se expone, para definir las características de virulencia de los *S. aureus* aislados de regiones particulares; para generar la información necesaria que permita la implementación de tratamientos más eficientes para la mastitis bovina subclínica.

La presencia del gen *blaZ* fue observada en el 100 % de los aislados analizados, mientras que sólo el 36.6 % resultó positivo para el gen *mecA* (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado con anterioridad, donde se mostró la presencia de estos genes en la totalidad de los aislados analizados^(19,29). La presencia de los genes *tetK*, *tetM*, *gyrA* y *gyrB* fue expresada de manera descendiente en función de los grupos analizados, lo cual es congruente con el fenotipo encontrado en los antibiogramas. Esta coherencia entre el fenotipo y el genotipo de resistencia bacteriana ya ha sido demostrada con anterioridad^(29,30), por lo que la resistencia observada se puede atribuir a la presencia y eventual expresión de los genes analizados⁽³¹⁾.

Cuadro 3: Análisis de genes de resistencia y formación de biofilm

| Aislados | | Genes de resistencia | | | | | | Biofilm | |
|-----------------------|----|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | <i>blaZ</i> | <i>mecA</i> | <i>tetK</i> | <i>tetM</i> | <i>gyrA</i> | <i>gyrB</i> | <i>icaA</i> | <i>icaD</i> |
| Grupo 1 | 1 | + | + | + | + | + | - | + | + |
| | 2 | + | + | + | - | + | + | + | + |
| | 3 | + | + | - | + | + | - | + | + |
| | 4 | + | + | - | - | + | - | + | + |
| | 5 | + | - | + | + | + | + | - | + |
| | 6 | + | + | - | - | + | + | + | + |
| | 7 | + | + | - | + | + | + | + | - |
| | 8 | + | - | + | + | + | + | + | + |
| | 9 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| | 10 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Presencia del gen (%) | | 100 | 80 | 40 | 70 | 100 | 70 | 90 | 90 |
| Grupo 2 | 1 | + | + | + | - | - | + | + | + |
| | 2 | + | - | + | - | - | - | + | + |
| | 3 | + | - | - | + | - | + | + | - |
| | 4 | + | - | + | - | - | - | + | + |
| | 5 | + | + | + | + | + | - | + | - |
| | 6 | + | + | + | + | - | - | + | + |
| | 7 | + | - | + | - | - | - | + | + |
| | 8 | + | - | + | - | - | - | - | + |
| | 9 | + | + | + | - | + | + | - | + |
| | 10 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Presencia del gen (%) | | 100 | 50 | 80 | 40 | 30 | 40 | 80 | 80 |
| Grupo 3 | 1 | + | - | + | - | - | - | + | + |
| | 2 | + | - | - | + | - | - | + | - |
| | 3 | + | - | + | + | - | - | + | + |
| | 4 | + | - | + | + | - | - | + | + |
| | 5 | + | + | + | + | - | + | + | + |
| | 6 | + | - | - | + | - | - | + | + |
| | 7 | + | - | - | - | - | - | - | + |
| | 8 | + | - | - | - | + | + | + | + |
| | 9 | + | - | - | - | - | + | + | + |
| | 10 | + | - | - | - | + | + | + | + |
| Presencia del gen, % | | 100 | 10 | 40 | 50 | 20 | 40 | 90 | 90 |
| Total, % | | 100.0 | 46.6 | 53.3 | 53.3 | 50.0 | 50.0 | 86.6 | 86.6 |

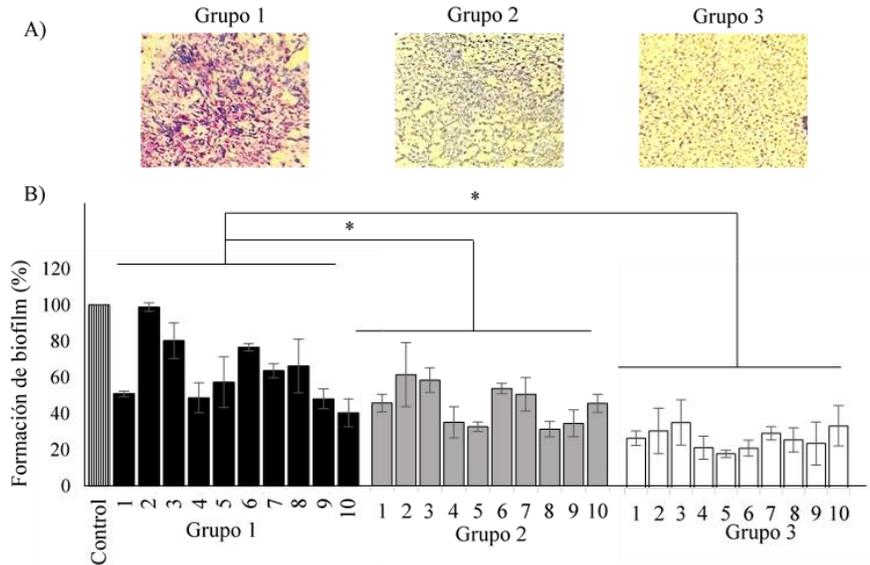
Formación de biofilm de *S. aureus* aislado de mastitis bovina

El análisis de la formación de biofilm mostró que la totalidad de los aislados presentaron la capacidad de formar biofilm con un rango del 20 a 98 %. Diversos estudios alrededor del mundo reportan que las cepas de *S. aureus* analizadas presentan la capacidad de formación de biofilm (90 a 99 %) ^(32,33), lo que coincide con el presente estudio.

Debido a que *S. aureus* presenta altos niveles de resistencia a antibióticos; es necesario analizar los factores y características de virulencia que posee esta bacteria para poder diseñar estrategias de control más eficientes. En este sentido, ya se ha reportado que *S. aureus* tiene la capacidad de formar biofilm ⁽³⁴⁾, lo cual puede estar relacionado con la baja efectividad que presentan los fármacos utilizados convencionalmente ⁽³⁵⁾.

Para establecer la posible relación entre la resistencia y la formación de biofilm en los 30 aislados provenientes de mastitis bovina, se siguió la siguiente estrategia. Primeramente, los resultados de formación de biofilm se analizaron en función del nivel de resistencia de los aislados (Figura 1); para lo cual, estos fueron ordenados en tres grupos como se describe en la sección de materiales y métodos. En el análisis de varianza de este estudio, solo el efecto de grado de resistencia resultó significativo ($P < 0.01$), encontrando que los niveles promedio de absorbancia de los aislados fueron de 1.34 (63.17 %), 0.77 (38.78 %) y 0.66 (26.28 %) para los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. En la comparación de medias, los grupos 1-3 fueron diferentes ($P < 0.05$) (Figura 1B). La correlación estimada entre el grado de resistencia y la formación de biofilm fue positiva (0.50) y significativa ($P < 0.01$) (Figura 2); además, estas diferencias fueron analizadas microscópicamente, donde la formación de biofilm en los aislados del grupo 1 se observaron incrementadas de manera importante en comparación con los otros dos grupos (Figura 1A). Debido a que la formación de biofilm por *S. aureus* induce al desarrollo de infecciones crónicas y recalcitrantes ⁽³²⁾, resalta la necesidad de analizar cómo es que esta característica de virulencia se relaciona con otros mecanismos como la resistencia a antibióticos. Con referencia a lo anterior, esta relación ha sido estudiada tanto en bacterias Gramnegativas ⁽³⁶⁻³⁹⁾ como Grampositivas ^(40,41); sin embargo, existen discrepancias al definir si la correlación que se presenta es positiva ^(42,43,44) o negativa ⁽⁴¹⁾. En este estudio, se observó que los aislados con una multiresistencia elevada presentan una mayor formación de biofilm; estableciéndose una correlación positiva, la cual es consistente con la mayoría de los trabajos reportados al respecto ^(42,43,44). Finalmente, se analizó la presencia de los genes *icaA*, *icaD*, los cuales se encuentran directamente relacionados con la formación de biofilm ⁽⁴⁵⁾. Interesantemente, se encontró que existe una alta frecuencia de ambos genes en los aislados (86.6 %), sin importar el grado de resistencia que presentan (Cuadro 3). Diversos autores coinciden con este resultado, ya que reportan una frecuencia cercana al 100 % de uno o ambos genes en las cepas de *S. aureus* formadoras de biofilm ^(46,47,48).

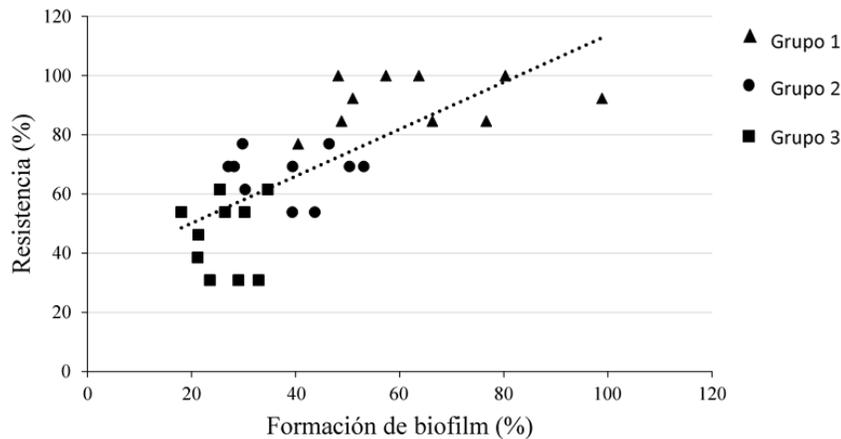
Figura 1: Formación de biofilm por los aislados de *S. aureus*. Para medir la formación de biofilm se utilizó el protocolo de tinción con cristal violeta.



A) Imágenes representativas de la tinción del biofilm en los tres grupos (Grupo 1: Resistencia alta, de 11 a 13 antibióticos; Grupo 2: Resistencia media, de 9 a 10 antibióticos y Grupo 3: Resistencia baja de 4-8 antibióticos), visualizadas con microscopía de campo claro.

B) El gráfico representa el porcentaje de formación de biofilm de los tres grupos de aislados. Se utilizó la cepa certificada de *S. aureus* ATCC 27543 como control positivo, cuyo valor de absorbancia se estandarizó como el 100 %. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm su desviación estándar. (*) representa diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($P \leq 0.001$).

Figura 2: Relación entre el porcentaje de resistencia y formación de biofilm (%) de los aislados de *S. aureus*



Conclusiones e implicaciones

Los aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina de los estados de Guanajuato y Michoacán, México, presentan elevados niveles de resistencia a antibióticos; así como una importante capacidad formadora de biofilm. Además, en el presente trabajo se demostró la existencia de una relación positiva entre estos dos factores. Estas características de virulencia pueden estar asociadas directamente con el bajo índice de eficacia clínica de los tratamientos utilizados de manera convencional en las granjas lecheras. La variabilidad de los resultados registrados en este estudio y otros reportes en diversas partes del mundo, ponen en evidencia la necesidad de realizar investigaciones sobre las características de virulencia de los microorganismos localizados en una ubicación geográfica específica y con ello establecer estrategias de manejo de la mastitis bovina de una manera integral y eficiente.

Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por la Universidad de Guanajuato a través de la Convocatoria 2018 (DAIP-CIIC-077/2018) y por La Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación Superior (MA-CFINN1042).

Literatura citada:

1. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Boletín de Leche. México. 2018.
2. Smith PB. Medicina interna de grandes animales. Serrales, DC (trad.). 4ta ed. Barcelona, España: Elsevier; 2010.
3. Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, Pyörälä S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. J Dairy Sci 2017;100(1):493–503.
4. Martínez-Sigales JM. Patología y clínica bovina recopilación de clases y relatos de la experiencia práctica de un veterinario de campo. Intermedica. Buenos Aires Argentina. 2016.
5. Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. Curr Microbiol 2016;72:377–382.
6. Monistero V, Graber HU, Pollera C, Cremonesi P, Castiglioni B, Bottini E, Ceballos-Marquez A. *et al.* *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: Genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. Toxins 2018;10:1-22.

7. Dorneles EMS, Fonseca MDAM, Abreu JAP, Lage AP, Brito MAVP, Pereira CR, Brandão HM, Guimarães AS, Heinemann MB. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. *Microbiologyopen* 2019;8:e736.
8. Thiran E, Di Ciccio PA, Graber HU, Zanardi E, Ianieri A, Hummerjohann J. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *J Dairy Sci* 2018;101:1000–1012.
9. Raza A, Muhammad G, Sharif S, Atta A. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: A review. *Mol Microbiol Res* 2013;3(1):1-8.
10. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:178:1-9.
11. Chen Y, Liu T, Wang K, Hou Ch, Cai S, Huang Y, Du Z, *et al.* Baicalein Inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro*. *Plos ONE* 2016;11(4):e0153468.
12. Varela-Ortiz DF, Barboza-Corona JE, González-Marrero J, León-Galván MF, Valencia-Posadas M, Lechuga-Arana AA, Sánchez-Felipe CG. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and *in vitro* efficacy of bacteriophage. *Vet Res Commun* 2018;42:243–250.
13. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk diffusion susceptibility test protocol. *Am Soc Microbiology*. 2016.
14. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th ed. CLSI supplement M100 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
15. Yang Y, Jiang X, Chai B, Ma L, Li B, Zhang A, Cole JR, Tiedje JM, Zhang T. ARGs-OAP: online analysis pipeline for antibiotic resistance genes detection from metagenomic data using an integrated structured ARG-database. *Bioinformatics* 2016;32(15):2346-2351.
16. Elhassan MM, Ozbak HA, Hemeg HA, Elmekki MA, Ahmed LM. Absence of the *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens in Shendi City, Sudan. *Bio Med Res Int* 2015;ID895860:1-5.
17. Hashem RA, Yassin AS, Zedan HH, Amin MA. Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt *J Infect Dev Ctries* 2013;7(11):796-803.
18. Chokshi A, Sifri Z, Cennimo D, Horng H. Global contributors to antibiotic resistance. *J Glob Infect Dis* 2019;11(1):36–42.

19. Yang F, Zhang S, Shang X, Li H, Zhang H, Cui D, Wang X, *et al.* Short communication: Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J Dairy Sci* 2020;103:840–845.
20. Li T, Lu H, Wang X, Gao Q, Dai Y, Shang J, Li M. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7(127):1-10.
21. Cheng J, Qu W, Barkema HW, Nobrega DB, Gao J, Liu G, De Buck J, *et al.* Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *J Dairy Sci* 2019;102:1–11.
22. Kadlec K, Entorf M, Peters T. Occurrence and characteristics of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in quarter milk samples from dairy cows in Germany. *Front Microbiol* 2019;10:1295.
23. Thongratsakul S, Usui M, Higuchi H, Takahashi T, Sato T, Poolkhet Ch, Tamura Y. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated in raw milk from cows in Hokkaido, Japan. *Trop Anim Health Prod* 2020;52(4):1631-1637.
24. Mistry H, Sharma P, Mahato S, Saravanan R, Kumar PA, Bhandari V. Prevalence and characterization of oxacillin susceptible mecA-positive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in India. *Plos ONE* 2016;11(9):e0162256.
25. Jiménez-Velásquez SC, Torres-Higuera LD, Parra-Arango GL, Rodríguez-Bautista JL, García-Castro FE, Patiño-Burbano RE. Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus spp.* obtenidos de leche bovina en Colombia. *Rev Argent Microbiol* 2020;52(2):121-130.
26. León-Galván MF, Barboza-Corona JE, Lechuga-Arana AA, Valencia-Posadas M, Aguayo DD, Cedillo-Pelaez C, Martínez-Ortega EA, Gutierrez-Chavez AJ. Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of Central Mexico. *Bio Med Res Int* 2015;2015:615153 1-9.
27. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodríguez F, Loeza-Ángeles H, Mascot-Chiquito N, Sánchez-Baca S, López-Meza JE. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008;94:199–206.
28. Karzis J, Petzer IM, Donkin EF, Naidoo V, Etter EMC. Climatic and regional antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in South African dairy herds. *Onderstepoort J Vet Res* 2019;86(1):e1-e9.

29. Yang F, Wang Q, Wang XR, Wang L, Li XP, Luo JY, Zhang SD, *et al.* Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. *J Integ Agr* 2016;15(12):2842–2847.
30. Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet Microbiol* 2016;193:156-61.
31. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews* 2017;41:430–449.
32. Avila-Novoa MG, Iñíguez-Moreno M, Solís-Velázquez OA, González-Gómez JP, Guerrero-Medina PJ, Gutiérrez-Lomelí M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. *Hindawi J Food Qual* 2018;ID1746139:1-8.
33. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruhewska A, Wofniak-Kosek A. Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. *BioMed Res Int* 2018; ID4657396:1-7.
34. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2011;2(5):445-459.
35. Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: A complex developmental organism. *Mol Microbiol* 2017;104(3):365–376.
36. Dumaru R, Baral R, Shrestha LB. Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. *BMC Res Notes* 2019;12(1):38.
37. Qi L, Li H, Zhang Ch, Liang B, Li J, Wang Li, Du X, *et al.* Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 2016;7:483.
38. Bawankar SK. Correlation of antibiotic resistance and biofilm formation amongst uropathogenic *E. coli*. *Indian J Appl Res* 2018;8:4.
39. Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, Xercavins M, *et al.* Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Microb Drug Resist* 2019;25:1.

40. Vitale M, Galluzzo P, Bu PB, Carlino E, Spezia O, Alduina R. Comparison of antibiotic resistance profile and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates derived from human specimens and animal-derived samples. *Antibiotics* 2019;8:97.
41. Zhang Y, Xu D, Shi L, Cai R, Li Ch, Yan H. Association between *agr* type, virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from pork production. *Front Microbiol* 2018;9:1876.
42. Tahmasebi H, Dehbashi S, Jahantigh M, Arabestani MR. Relationship between biofilm gene expression with antimicrobial resistance pattern and clinical specimen type based on sequence types (STs) of methicillin-resistant *S. aureus*. *Mol Biol Rep* 2020;47(2):1309-1320.
43. Lin Q, Sun H, Yao K, Cai J, Ren Y, Chi Y. The prevalence, antibiotic resistance, and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in bulk Ready-to-eat foods. *Biomolecules* 2019;9:524.
44. Kwon AS, Park GC, Ryuc SY, Limd DH, Lime DY, Choi CL, Park Y, Lima Y. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:68–72.
45. O’Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;270:179–188.
46. Castelani L, Pilon LE, Martins T, Rodrigues-Pozzi C, Rodriguez-Pozzi Arcaro J. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. *Anim Sci J* 2015;86(3):340-4.
47. Gad GFM, El-Feky MH, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RMA. 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.
48. Kivanc SA, Arik G, Akova-Budak B, Kivanc M. Biofilm forming capacity and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* spp. with the *icaA/icaD/bap* genotype isolated from ocular surface of patients with diabetes. *Malawi Med J* 2018;30 (4):243-249.
49. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun* 2010;34:81–89.
50. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol* 1992;30:1654–1660.