



CARACTERIZACION DE FENOTIPOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PRODUCTORES DE SLIME Y FORMADORES DE BIOFILM EN AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE VACAS LECHERAS CON MASTITIS SUBCLINICA †

[CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PHENOTYPES SLIME PRODUCERS AND BIOFILM FORMATION IN ISOLATES OBTAINED FROM DAIRY COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS]

Gerardo Mancera-Cuadros¹, Jorge Acosta-Dibarrat¹, José Luis Zamora-Espinoza¹, Benjamín Valladares-Carranza¹, Adriana del Carmen Gutiérrez-Castillo¹, José Luis Carlos Bedolla-Cedeño², Donald Arguedas-Cortés³ and Valente Velázquez-Ordoñez^{1*}

¹*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Km. 15.5 Carretera Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México. C.P. 50295. E-mail. vvo@uaemex.com*

²*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Carretera Morelia – Zinapécuaro Km. 9.5, Tarimbaro, Michoacán, México*

⁵*Laboratorio de Agrobiotecnología Molecular del Área de Investigación y Transferencia de la Universidad Técnica Nacional, Sede Guanacaste, Costa Rica*

**Corresponding author*

SUMMARY

Background. *Staphylococcus aureus* is considered the main causal agent of mastitis in dairy herds globally, affecting milk production and constituting a potential risk to public health. The presence of virulence factors such as biofilm formation and slime production favor colonization and persistence of the mammary gland infections. **Objective.** The study aims to characterize the phenotypes of slime-producing and biofilm-forming *S. aureus* associated with subclinical mastitis with different CMT (California Mastitis Test) degrees and their relationship with the persistence of infection. **Methodology.** To characterize the slime-producing and biofilm-forming *S. aureus* phenotypes, 116 individual milk samples were taken from cows with subclinical mastitis through the CMT, obtaining 80 *S. aureus* isolates. Slime production on Congo Red agar was determined *in vitro*, and the conformation of bacterial clusters adherent identified biofilm formation to rigid surfaces and crystal violet staining. **Results.** 68.8% (55) of the isolates produced slime, of which 20% (16) were considered as producers and 48.8% (39) as intermediate producers. 82.5% (66) of the total isolates were related to the formation of biofilm in different degrees; 1.25% (1) very high trainer, 41.25% (33) high trainer, and 40.0% (32) moderately trainer. Highly biofilm-forming isolates were associated with subclinical mastitis degrees 2 and 3 of the CMT. **Implications.** The verification of slime and biofilm formation in most of *S. aureus* isolations obtained from subclinical mastitis may imply that their presence is related to the condition's persistence and severity. **Conclusion.** The association between the phenotypes of slime-producing and biofilm-forming *S. aureus* was established with high degrees of the CMT and mammary infection persistence in the cows studied.

Key words: *Staphylococcus aureus*, slime, biofilm, dairy cows, mastitis.

RESUMEN

Antecedentes. *Staphylococcus aureus* es considerado el principal agente causal de mastitis en los hatos lecheros en el mundo, afectando la producción lechera y constituyendo un riesgo potencial para la salud pública. La presencia de factores de virulencia como la formación de biofilm y la producción de slime favorecen la colonización y persistencia de la infección en la glándula mamaria. **Objetivo.** El estudio tiene como objetivo caracterizar los fenotipos de *S. aureus* productores de slime y formadores de biofilm asociados con la mastitis subclínica con diferentes grados de CMT (California Mastitis Test) y su relación con la persistencia de la infección. **Metodología.** Para caracterizar los fenotipos *S. aureus* productores de slime y formadores de biofilm se tomaron 116 muestras individuales de leche de vacas con mastitis subclínica a través de la prueba de CMT, obteniéndose 80 aislamientos de *S. aureus*. Se determinó *in vitro* la producción de slime en agar Rojo Congo y la formación de biofilm fue identificada por la conformación de

† Submitted November 9, 2020 – Accepted January 10, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

conglomerados bacterianos adherentes a superficies rígidas y la tinción de cristal violeta. **Resultados.** El 68.8% (55) de los aislamientos produjeron slime, de los cuales 20% (16) se consideraron como productores y 48.8% (39) como productores intermedios. El 82.5% (66) del total de aislamientos se relacionaron con la formación de biofilm en distintos grados; 1.25 % (1) muy alto formador, 41.25% (33) alto formador y 40.0% (32) moderadamente formador. Los aislamientos altamente formadores de biofilm se relacionaron con mastitis subclínicas grados 2 y 3 de la prueba de CMT. **Implicaciones.** La comprobación de la formación de slime y biofilm en la amplia mayoría de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de mastitis subclínicas, puede implicar que su presencia esté relacionada con la persistencia y la severidad del cuadro. **Conclusión.** Se estableció la asociación entre los fenotipos de *S. aureus* productoras de slime y formadores de biofilm con grados altos de la prueba de CMT y con la persistencia de la infección mamaria en las vacas estudiadas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, slime, biofilm, vacas lecheras, mastitis.

INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es considerado el principal agente causal de la mastitis en los hatos lecheros a nivel mundial (De Oliveira *et al.*, 2000). La persistencia de la infección y la inflamación crónica de la glándula mamaria (Velázquez *et al.*, 2005a) provocan altos conteos de células somáticas (Kelly *et al.*, 2000) y alteración en la composición físico-química de la leche (Jørgensen *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2016). La expresión de los factores de virulencia del *S. aureus* se relaciona con el desarrollo y persistencia de la infección en el ganado lechero (Velázquez *et al.*, 2005b, Zecconi y Scali, 2013). La virulencia del *S. aureus* determina la severidad de la infección intramamaria (Begum *et al.*, 2004) y está asociada con la habilidad de adhesión y colonización del agente en la glándula mamaria (Aguilar *et al.*, 2001, Dhanawade *et al.*, 2010) y la evasión de los mecanismos de la inmunidad innata (Foster *et al.*, 2014). En la infección por *S. aureus* se identifican cepas productoras de exopolisacáridos de la pared bacteriana que intervienen en la citoadherencia al tejido glandular (Citack *et al.*, 2003, Takamatsu *et al.*, 2008). El slime y el biofilm son factores de virulencia derivados de exopolisacáridos estructurales de la pared bacteriana, los cuales intervienen en la colonización y resistencia a la opsonización, y fagocitosis del *S. aureus* (Von Eiff *et al.*, 1999, Hanke y Kielian, 2012, Scherr *et al.*, 2015). Al mostrar resistencia a la fagocitosis por los neutrófilos las cepas de *S. aureus* tienden a desarrollar la cronicidad de la mastitis en las vacas lecheras (Zecconi y Scali, 2013, Montoya *et al.*, 2015, Bardiaua *et al.*, 2016). En la epidemiología de la infección por *S. aureus*, la formación de biofilm puede asociarse con la disminución de la sensibilidad a los antibióticos (Fox *et al.*, 2005, Arslan y Özkardes, 2007). Las cepas de *S. aureus* productoras de biofilm producen infecciones hospitalarias y lesiones cutáneas crónicas en humanos (Costerton *et al.*, 1999, Archer *et al.*, 2011), las presentes en el ganado lechero pueden producir infecciones cruzadas con el humano (Zadoks *et al.*, 2004, Schmidt *et al.*, 2017). Mediante el uso de biomarcadores de virulencia de *S. aureus* (Begum *et al.*, 2007), los fenotipos productores de slime y biofilm se pueden identificar, en medios de cultivo con Rojo Congo que evidencia la producción de slime (Freeman

et al., 1999). La detección *in vitro* de la formación de biofilm se determina por la capacidad de adherencia del *S. aureus* a superficies inertes, evidenciada mediante la tinción de cristal violeta (Christensen *et al.*, 1982; Christensen *et al.*, 1985). La persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria es el origen de la contaminación de la leche lo cual interfiere en la inocuidad de los procesos y en los productos obtenidos de transformación de la leche (Ginestre *et al.*, 2017).

En los hatos lecheros la detección de animales con mastitis subclínica, así como los cuartos glandulares afectados se determinan con la prueba de mastitis California, estableciendo su posible relación con la infección de la glándula mamaria (Manjarrez *et al.*, 2012). En el valle de Toluca el tipo de producción lechera predominante es la familiar a baja escala, mostrando una alta prevalencia de mastitis por *S. aureus* asociada a biotipos de origen humano-bovino, afectando la calidad de la leche implicando un riesgo en salud pública (Manjarrez *et al.*, 2012). Lo anterior vuelve necesario determinar la relación existente entre la severidad y persistencia de la mastitis subclínica en las vacas lecheras relacionada con los fenotipos de *S. aureus* productores de slime y biofilm con el fin de establecer medidas de prevención y control efectivas. Con estos puntos de partida el objetivo del estudio fue caracterizar los fenotipos de *S. aureus* productores de slime y formadores biofilm asociados con diferentes grados de mastitis subclínica y su relación con la persistencia de la infección en la glándula mamaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte longitudinal en un hato lechero a baja escala ubicado en el municipio de Toluca, Estado de México, localizado a 19°24' Latitud norte y 99°40' Longitud oeste del meridiano de Greenwich, a 2600 metros sobre el nivel del mar, con un clima C(w2)(w)b(l)g, templado subhúmedo con lluvias en verano-otoño de acuerdo, con la clasificación de Koeppen, con un rango de temperatura de 12 a 18°C y una media anual de 16°C y una precipitación pluvial anual de 800 a 1200 mm.

Población animal y manejo del ordeño

El hato lechero estudiado contaba con una población total de 30 vacas de la raza Holstein de 3.5 partos en promedio y lactancias de 2 a 7 meses, con sistema de ordeño mecánico en línea. Las vacas se encontraban bajo un sistema de producción tradicional semi-intensivo en condiciones de pastoreo diurno de 6 a 7 hrs., en praderas de Rye Grass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), complementado en pesebre con pradera de corte y ensilado de maíz (*Zea maize*), y suministro de concentrado balanceado con 17% de proteína cruda de acuerdo con la etapa de lactación y nivel de producción de leche. El hato se encontraba en un programa sanitario de prevención de la brucelosis y tuberculosis (SAGARPA-SENASICA, 2010), sin embargo, el manejo del ordeño no contemplaba medidas para la prevención y control de la mastitis como higiene adecuada de la ubre previo al ordeño, pre-sellado y sellado de pezones, ni controles rutinarios de la salud de las ubres de las vacas del hato a través del CMT. Con respecto a la higiene y mantenimiento del equipo de ordeño se constató la presencia de pezoneras con hules agrietados con presencia de suciedad en el interior, no se contaba con un plan preestablecido de lavado combinando diferentes detergentes y desinfectantes, ni controles calendarizados para el mantenimiento. El estudio se llevó a cabo sin realizar cambios en la rutina del ordeño y en las condiciones de manejo sanitario o productivo del hato. El alojamiento, el manejo de los animales y las condiciones de higiene no cumplían en su totalidad con lo establecido en el Manual de Buenas Prácticas pecuarias en unidades de producción de leche bovina (SAGARPA-SENASICA, 2010).

Obtención de las muestras

Se realizó la prueba de California para la detección de mastitis (CMT) al total de las vacas en línea de producción, durante un periodo consecutivo de cuatro semanas, de manera semanal antes de realizar la toma de la muestra de leche para el estudio bacteriológico (Capuco *et al.*, 1986). Se obtuvieron un total de 116 muestras de leche individuales por cada cuarto mamario funcional de las vacas en producción con reacciones CMT positivas, de grado traza (T) a grado 3. La toma de muestra se realizó en tubos Falcon estériles de 50 ml, previa eliminación de los primeros chorros de leche y asepsia del pezón con alcohol etílico 70 % v/v. Las muestras se transportaron en refrigeración a 4°C y se procesaron en un tiempo no mayor de 4 hrs.

Aislamientos e identificación bacteriana

El aislamiento e identificación bacteriológica del *S. aureus* se llevó a cabo bajo el protocolo descrito por el National Mastitis Council (2004). Brevemente, se

homogeneizó la leche, se tomaron 10 µl de esta que se inocularon en placas de agar sangre y sal manitol, las placas se incubaron a 37°C durante 24 hrs. Las unidades formadoras de colonia (UFC), se describieron e identificaron mediante la tinción de Gram, hemólisis en las placas de agar sangre, oxidación manitol en placas de medio sal y manitol; las pruebas de catalasa y coagulasa en tubo (Llarrull *et al.*, 2009), producción de DNAsa reacción Voges Proskauer, fermentación anaerobia de manitol y aerobia de la maltosa. Los aislamientos de *S. aureus* se conservaron a -20°C, con caldo infusión cerebro y corazón y glicerol 30% v/v (Bautista *et al.*, 2013) para posteriormente realizar las pruebas de biofilm y slime. Se determinó la persistencia de la infección por el aislamiento positivo de *S. aureus* en al menos dos muestreos del mismo cuarto mamario con presencia de algún grado de mastitis subclínica.

Identificación de fenotipos *Staphylococcus aureus* productores de slime y biofilm

La producción de slime se determinó en ensayos por triplicado utilizando el método cualitativo de crecimiento de *S. aureus* en agar Rojo Congo (infusión cerebro corazón 37g/L, 12 grs de agar agar, suplementado con 50 g/L de sucrosa y 0.8 g/L de Rojo Congo), siguiendo el procedimiento descrito por Freeman *et al.*, (1989). Brevemente, de cada aislamiento se preparó el inóculo en caldo cerebro y corazón (BHI) que se incubó 4 hrs. a 37°C, una vez obtenido el inóculo se depositó sobre las placas de agar Rojo Congo incubándose en aerobiosis durante 24 hrs. a 37°C, las placas con las unidades formadoras de colonia (UFC), se retiraron y mantuvieron a temperatura ambiente por 48 hrs. La producción de slime positiva en las UFC se identificó por una coloración negra y consistencia cristalina y seca, mientras que las UFC de producción intermedia de slime presentaron coloración oscura con ausencia de apariencia cristalina y seca. Las UFC slime negativas en la superficie de las placas de agar Rojo Congo mostraron una coloración roja o rosa (Freeman *et al.*, 1989; Milanov *et al.*, 2010; Peña y Uffo, 2013).

La formación de biofilm en los aislamientos de *S. aureus* se caracterizó por la formación de conglomerados de UFC adherentes en superficies rígidas, identificadas por la prueba de tinción de cristal violeta de poblaciones bacterianas adheridas a superficies inertes, por el método de Christensen *et al.*, (1982). Brevemente, la formación de biofilms se evaluó en tubos Falcon conteniendo 5 mL de BHI, se inocularon los aislamientos de *S. aureus* y se incubaron a 37°C por 48 hrs. La adherencia de los conglomerados de UFC en la superficie del tubo se determinó mediante tinción con una solución de cristal violeta al 3% v/v, la cual fue distribuida por rotación manual en la superficie de los tubos durante tres minutos,

posteriormente se extrajo cuidadosamente y los tubos se dejaron secar a 37°C durante una noche.

La formación de biofilm se evaluó a partir de una escala de puntuación de 0 a 3 para cada tercio de la porción del tubo. De la abundancia de agregados bacterianos adheridos a las diferentes porciones del tubo se obtuvo un puntaje cuya suma determinó la puntuación general de 0 a 9 (Christensen *et al.*, 1985). Los aislamientos de *S. aureus* positivos a la formación de biofilm fueron considerados en una escala de puntuación general mayor a 5 puntos (6 a 9) en la sumatoria obtenida de las diferentes porciones evaluadas del tubo Falcon.

Se determinó la relación entre la formación de biofilm y el grado de mastitis, así como la persistencia de la infección en la glándula mamaria con la presencia de biofilm y slime a través de la prueba Ji-cuadrada con $p < 0.05$. Se utilizó el software SPSS 16 (IBM, USA).

RESULTADOS

Del total de las vacas en producción del hato lechero 90% (27 vacas) resultaron positivas a las pruebas de California en al menos dos cuartos. Del total de las 116 muestras de leche analizadas se obtuvieron 80 aislamientos de *S. aureus*, determinando una frecuencia de aislamiento de 69%.

Fenotipos de *Staphylococcus aureus* formadores de slime

En los aislamientos obtenidos se identificaron los tres fenotipos con respecto a la producción de slime: productores de slime (20%), productores intermedios (48.8%) y negativos (31.2%) (Tabla 1, Figura 1). Algunos aislamientos expresaron la producción de slime de forma débil a las 24 hrs., mejorando sus características fenotípicas y diferenciación en el medio de Rojo Congo a las 48 hrs., después de la incubación a temperatura ambiente.

Formación de biofilm por aislamientos de *Staphylococcus aureus*

En este estudio el 41.25% de aislamientos evaluados se consideraron altamente productores de biofilm (6-8 puntos), 1.25% aislamientos fueron identificados como muy altamente formadores (9 puntos), 40% del total de los aislamientos evaluados se identificaron como medianamente formadores (4-5 puntos) y 17.5% se caracterizaron negativos (2-3 puntos) (Tabla 1, Figura 2).

Del total de los aislamientos obtenidos de vacas con mastitis subclínica, 55 (el 68.8%) resultaron productoras de slime en algún grado. Mientras que 66 aislamientos (82.5%) resultaron formadoras de biofilm en algún grado. (Tabla 1, Figuras 1 y 2).

La relación entre la formación de biofilm y las reacciones de la prueba de mastitis California con el número de aislamientos de *S. aureus* determinó que los aislamientos alto formadores y muy alto formadores se relacionaron significativamente ($p < 0.05$) con las pruebas de California grados 2 y 3. En tanto que aquellos aislamientos que tuvieron una formación moderada se relacionaron con pruebas de California que variaron entre grados de trazas a 2. Finalmente, las pruebas de California de trazas a 1 se relacionaron con aislamientos que no formaron biofilm (Tabla 2).

Tabla 1. Producción de slime y formación de biofilm *In vitro* de *Staphylococcus aureus* obtenidos de vacas con mastitis subclínica.

Fenotipo	Característica <i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Número	%
Slime*	N	25	31.2
	I	39	48.8
	P	16	20.0
Biofilm**	N	14	17.5
	M	32	40.0
	A	33	41.2
	MA	1	1.25

Característica *In vitro*: *Slime: N, negativos; I, productores intermedios; P, productores. **Biofilm: N, no formadores; M, moderados formadores; A, altos formadores; MA muy altos formadores.

La relación de los aislamientos de *S. aureus* productores de slime y formadores de biofilm y la persistencia de la infección en la glándula mamaria en las vacas lecheras se observan en la Tabla 3.

La producción de slime relacionada con la persistencia de la infección por *S. aureus* en vacas lecheras estudiadas con mastitis subclínica mostró diferencias significativas ($p < 0.025$). Al realizar el análisis de la formación de biofilm en relación con la persistencia de la infección también hubo diferencias significativas ($p < 0.025$) entre los aislamientos procedentes de vacas que presentaron mastitis persistente y no persistente.

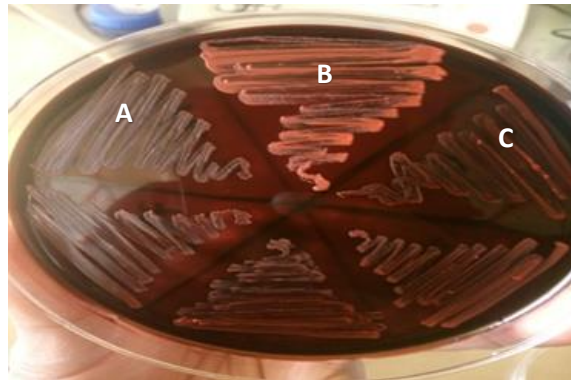


Figura 1. Expresión *in vitro* fenotipo slime cultivos de *S. aureus* en agar Rojo Congo. A) Positivo: color negro apariencia cristalina seca, B) Negativo, color rosa. C) Intermedio: oscuras y ausencia de apariencia cristalina y seca.

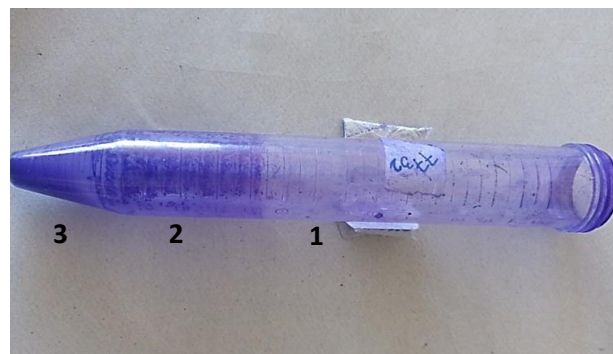


Figura 2. Formación de biofilm superficies rígidas. Tubo Falcon, 1) superficie, 2) pared y 3) fondo, se observa fuerte presencia de adherencia bacteriana.

Tabla 2. Distribución *Staphylococcus aureus* productores de biofilm en la prueba de mastitis California.

Escala General Puntuación	Aislamientos Número	Aislamientos %	Formación biofilm	Prueba de mastitis California*
0-3	14	17.5%	No formadores	T, 1
4-5	32	40%	Moderado formador	T, 2
6-8	33	41.25%	Alto formador ^a	2, 3
9	1	1.25%	Muy alto formador ^a	3

Aislamientos *Staphylococcus aureus* (n=80). *Grados Prueba de mastitis California (número estimado Células Somáticas/mL leche): Grado T (200,000 a 400,000), Grado 1 (500,000 a 1,200,000), Grado 2 (1,200,000 a 5,000,000), Grado 3 (> 5,000,000).

^a p<0.05

Tabla 3. Infección por *Staphylococcus aureus* productores de slime y formadores de biofilm.

Tipo de Infección mamaria	Número de Vacas	Slime (%)	Biofilm (%)
Persistente	28 (93.3%)	55 ^a (69.9%)	66 ^c (82.8%)
No persistente	2 (6.7%)	25 ^b (31.1%)	14 ^d (17.2%)

^{a,b} significativo al p<0.025 para producción de slime, ^{c-d} significativo al (p>0.025) para formación de biofilm.

DISCUSIÓN

El estudio confirma la presencia de altos porcentajes de *S. aureus* formadores de slime y biofilm relacionados con grados altos de mastitis subclínica en los animales estudiados. Las condiciones del ordeño, así como el inadecuado mantenimiento del equipo de ordeño pueden haber contribuido a la alta frecuencia de vacas con mastitis subclínica y de aislamientos de *S. aureus* formadores de biofilm y productores de slime (Cucarella *et al.*, 2004; Camussone y Calvino, 2013). En los aislamientos evaluados se observaron diferencias en la frecuencia de fenotipos de *S. aureus* asociados con la producción de slime y formación de biofilm, coincidiendo los resultados con los obtenidos por Aguilar *et al.*, (2001), al estudiar cepas de *S. aureus* obtenidas de bovinos y ovinos de España. El fenotipo de slime identificado correspondió con lo descrito por Freeman *et al.*, (1989). En el estudio se presentaron aislamientos con expresión débil de slime a las 24 horas de incubación mejorando su diferenciación a las 48 horas a temperatura ambiente, lo cual fue observado también por Arciola *et al.*, (2001), quienes evaluaron *S. aureus* obtenidos de catéteres involucrados en infecciones humanas hospitalarias. Así mismo se han identificado diferencias en las características morfológicas de las UFC de *S. aureus* asociadas al fenotipo de slime (Milanov *et al.*, 2010), mostrando las diferencias en coloración, consistencia, brillo y apariencia de la superficie (lisa o rugosa). Peña y Uffo, (2013), confirman las características morfológicas del *S. aureus* del fenotipo slime en las placas de agar, los aislamientos slime positivos desarrollan UFC oscuras de aspecto cristalino seco, los aislamientos negativos a la producción de slime desarrollan una coloración roja o rosácea, lo que coincide con lo observado en los aislamientos evaluados en este estudio. Así mismo la interpretación de los ensayos para identificar los aislamientos de *S. aureus* positivos a la producción de slime sobre las placas de agar Rojo Congo, fue similar con los estudios realizados por Citack *et al.*, (2003) quienes coinciden al indicar que los fenotipos slime positivo, correspondieron a UFC de color oscuro, aspecto seco y brillante. Otros autores señalan UFC productoras de slime a aquellas que muestran solamente una coloración negra (Oliveira *et al.*, 2006, Arslan y Özkardes, 2007, Jain y Agarwal, 2009), estos mismos autores caracterizaron las UFC de *S. aureus* negativas a la producción de slime aquellas de color rojo o rosado. Cucarella *et al.*, (2004), indica que las variaciones interpretadas en la coloración de las UFC en los fenotipos de *S. aureus* slime positivos dependen de la composición y características del medio de cultivo empleado.

En este estudio la frecuencia del fenotipo alto productor de slime fue de 20% lo que se asemeja con frecuencia de aislamientos *S. aureus* slime positivos en Turquía de 37.5% (Ciftci *et al.*, 2009) y Polonia 37.2%

(Krukowski *et al.*, 2008). Mientras que en Estados Unidos más de 90% de *S. aureus* expresaron el fenotipo slime (Vasudevan *et al.*, 2003) sin embargo estos aislamientos provenían de casos clínicos de mastitis. En los estudios realizados por Citak *et al.*, (2003), y por Milanov *et al.*, (2010), indican una frecuencia menor de aislamientos de *S. aureus* productores de slime del 5.1 y 11.42% respectivamente. Existe una amplia variabilidad en los porcentajes de detección en la producción de slime descritas a lo largo del mundo, esto se puede deber el origen de los aislamientos estudiados algunos de los cuales proceden de casos clínicos y en otros de casos de mastitis subclínica, en este sentido el trabajo logra relacionar el grado de la mastitis subclínica, con la persistencia y las características del slime producido.

En el presente estudio la expresión en la formación de biofilm del *S. aureus* en los aislamientos se consideró alta 42.4% con 33 aislamientos alto formadores y un aislamiento muy alto formador de biofilm, pero si consideramos también a los moderadamente formadores el porcentaje asciende al 82.8%. El hallazgo difiere de lo encontrado en Cuba con un 98% de aislamientos altamente formadores de biofilm, es relativamente similar a lo encontrado en Portugal por Oliveira *et al.*, (2006) con una frecuencia de 37,5 y muy superior a lo encontrado Milanov *et al.*, (2010) en Serbia que fue de 12.85%. Por otro lado, los porcentajes de detección fenotípica del biofilm pueden depender de variaciones en la técnica empleada o en su interpretación (Oliveira *et al.*, 2006; Milanov *et al.*, 2010), así mismo la determinación de los genes responsables de la producción de biofilm como *ica A* y *D* no garantiza su expresión ya que puede haber otros genes implicados (Peña y Uffo, 2013). Debido a que el biofilm constituye una estructura que permite a las bacterias resistir las condiciones ambientales adversas como la desecación, la falta de nutrientes o de hospedero (Stewart *et al.*, 2013), las cepas altas productoras de biofilm tendrán más opciones de sobrevivir en el entorno de la vaca, por ejemplo: en el equipo de ordeño (pezoneras, tuberías, tanques de almacenamiento), cama del animal, piel, instrumentos. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que los biofilm no suelen ser removidos luego de sucesivos lavados en biomateriales (Dego *et al.*, 2002), se debe considerar y estudiar si la rutina de limpieza es suficiente para eliminar el biofilm en el equipo de ordeño. Posiblemente la falta de una rutina y control adecuados en la higiene y mantenimiento del equipo de ordeño contribuya a la alta frecuencia de aislamientos en los casos de mastitis subclínica (Peña y Uffo, 2013). Si bien el objetivo de este trabajo no fue comparar los sistemas de producción con la presencia de aislamientos altamente productores de slime, las características del establecimiento de estudio con falta de mantenimiento y programas de limpieza y desinfección del equipo puede haber contribuido a los

altos porcentajes de aislamientos productores de biofilm obtenidos de las vacas del estudio.

En este estudio los aislamientos de *S. aureus* formadores de biofilm se identificaron asociados a la mastitis subclínica en diferentes grados determinada por prueba de mastitis California concordando con los resultados de los estudios de Peña y Uffo, (2013), quienes además identificaron diferencias en los grados de formación de slime relacionados con diferentes genotipos *Spa* en aislamientos de *S. aureus* obtenidos en hatos lecheros de Cuba. Así mismo se ha establecido una relación de los tipos capsulares de *S. aureus* con la formación de biofilm (moderada, alta y muy altamente formadores), determinando al tipo capsular 5 como el más virulento y asociado con mayor frecuencia a la presentación y persistencia de la mastitis subclínica (Bardiau *et al.*, 2016). La infección por *S. aureus* productores de biofilm, en la glándula mamaria en las vacas lecheras (Fox *et al.*, 2005), se relaciona con la contaminación de la leche y los derivados lácteos frescos elaborados con leche no pasteurizada, lo cual representa un problema de salud pública (Díaz *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Se identificaron fenotipos de *S. aureus* productores de slime y formadores de biofilm en vacas con mastitis subclínica. La mayoría de los aislamientos *S. aureus* fueron productores y productores intermedios de slime y altamente y muy altamente formadores de biofilm los cuales se asociaron con los grados altos de la prueba de CMT (2 y 3) y con la persistencia de la infección. Es posible considerar que la producción de slime y la formación de biofilm serían mecanismos importantes de patogenicidad responsables de la persistencia de la infección en la glándula mamaria.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para cursar estudios de posgrado del primer autor (PCARN-UAEM-CONACYT).

Financiamiento. El proyecto fue financiado por la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEM a través de los proyectos con claves 3848/2013CHT y 3783/2014/CIC.

Conflicto de interés. Los autores declaran que no hay conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

Cumplimiento de estándares de ética. Los autores declaran que todos los procedimientos que contribuyeron a la realización de este trabajo cumplen con los estándares éticos de la UAEM.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con el autor por correspondencia (vvo@uaemex.mx), con previa solicitud.

REFERENCIAS

- Aguilar, B., Amorena, B., Iturralde, M. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 78: 183–191. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00287-X
- Arciola, C.R., Baldassarri L., Montenaro L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2151–2156. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001
- Bardiau, M., Caplin, J., Detilleux, J., Graber, H., Moroni, P., Taminiau, B., Mainil, J. G. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology*. 185:1–6. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.01.003
- Bautista-Trujillo, G.U., Solorio-Riveran, J.L., Rentería-Solorzano, I., Carranza-Germán, S.I., Bustos-Martínez, J.A., Arteaga-Garibay, R.I., Baizabal-Aguirre, V.M., Cajero-Juárez, M., Bravo-Patiño, A., Valdez-Alarcón, J.J. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology*. 62: 369–376. DOI: 10.1099/jmm.0.046284-0
- Camussone, C.M., Calvino, L.F. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*. 45(2):119-130. DOI: 10.1016/S0325-7541(13)70011-7
- Capuco, A.V., Paape M.J., Nickerson S.C. 1986. *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissue of lactating cows. *American Journal of Veterinary Research*. 47:663-668.
- Christensen, G. D., Bisno, A. L., Parisi, J. T., McLaughlin, B., Hester, M. G., Luther, R. W. 1982. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Internal Medicine*. 96:1-10.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., Beachey, E. H. 1985. Adherence of Coagulase-Negative staphylococci to plastic tissue culture

- plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 22: 996-1006.
- Ciftci, A., Findik A., Emek Onuk E., Savasan, S. 2009. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 254-261. DOI: 10.1590/S1517-83822009000200009
- Citak, S., Varlik, Ö., Gündogan, N., 2003. Slime production and DNase activity of staphylococci isolated from raw milk. *Journal of Food Safety*. 23: 281-288. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2003.tb00371.x
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
- Cucarella, C., Tormo, M.Á., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. 2004, Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 72: 2177-2185. DOI: 10.1128/iai.72.4.2177-2185.2004
- De Oliveira, AP., Watts, JL., Salmon, SA., Aarestrup, FM. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*. 83(4), 855-862. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74949-6
- Dego, O.K., Van Dijk, J., Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary Quarterly*. 24:181-198. DOI: 10.1080/01652176.2002.9695135.
- Díaz, G. E. P., Valladares, C. B., Gutiérrez C. A. del C., Arriaga J. C. M., Quintero-Salazar B., Cervantes A. P., Velázquez O. V. (2017) Fresh Cheese Characterization Marketed at Fixed and Popular Markets of Toluca´s Municipality. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8(2):139-146. DOI: 10.22319/rmcp.v8i2.4419
- Foster T., Geoghegan J., Ganesh V., Hook M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*. 12: 49-62. DOI: 10.1038/nrmicro3161
- Fox, L. K., Zadoks, R. N., Gaskins, C. T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*. 107: 295–299. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.02.005
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 42: 872-874. DOI: 10.1136/jcp.42.8.872
- Jain, A., Agarwal, A., 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiological Methods*. 76: 88-92. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.09.017
- Jørgensen, H J., Mørk, T., Rørvik, LM. 2005. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* 88:3810–3817. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73066-6
- Kelly, AL., Tiernan, D., O’Sullivan, C., Joyce, P. 2000. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *Journal of Dairy Science*. 83:300–304. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74878-8.
- Krukowski, H., Szymankiewicz, M., Lisowski, A. 2008. Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Polish Journal of Microbiology*. 57(3): 253-255.
- Llarrull, L. I., Fisher, J. F., Mobashery, S. 2009. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new β -Lactams that meet the challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(10): 4051-4063. DOI: 10.1128/AAC.00084-09
- Manjarrez, A. M. L., Días, S. Z., Salazar, F. G., Valladares, B. C., Gutiérrez, A. C. C., Barbabosa, A. P., Talavera, M. R., Alonso, M. U. F., Velázquez, V. O. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en el centro-este del Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3: 265-274.
- Milanov, D., Lazia, S., Vidia, B., Petrovia, J., Bugarski, D., Šeguljev, Z. 2010. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta veterinaria*. 60 (2): 217-226.
- Montoya N.G., Peñuela C. G. R., Acosta J. P. D., Velázquez V. O. 2015. Differential phagocytic activity and in vitro induction of apoptosis by *Staphylococcus aureus* capsular types 5 and 8 in

- bovine neutrophils. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 6:99-108
- National Mastitis Council (NMC). 2004. Microbiological procedures for use in the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4ta ed. Verona, Wisconsin.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. México 6 de Diciembre de 1999.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela C. L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*. 118: 133–140. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.07.008
- Peña, J., Uffo, O. 2013. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Revista de Salud Animal*. 35: 189-196
- SAGARPA-SENASICA. Manual de Buenas Prácticas pecuarias en unidades de producción de leche bovina. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). México, DF. 2010.Pp. 7-107.
- Scherr, TD., Hanke, ML., Huang, O., James, DBA., Horswill, AR., Bayles, KW., Fey, PD., Torres, VJ., Kielian, T. 2015. *Staphylococcus aureus* biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin. *mBio*. 6(4): e01021-15. DOI:10.1128/mBio.01021-15.
- Silva, V. N., Rangel, A. H. N., Galvão Júnior, J. G. B., Urbano, S. A., Borba, L. H. F., Novaes, L. P., Lima Júnior D. M. (2016). Influence of somatic cell count in the composition of Girolando cow's milk in tropical zone. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19: 101-107.
- Stewart, E.J., Satorius, A.E., Younger, J.G., Solomon, M.J. 2013. Role of environmental and antibiotic stress on *Staphylococcus epidermidis* biofilm microstructure. *Langmuir*. 29: 7017-7024. DOI: 10.1021/la401322k.
- Takamatsu, D., Hata, E., Osaki, M., Aso, H., Kobayashi, S., Sekizaki, T. 2008. Role of SraP in adherence of *Staphylococcus aureus* to the bovine mammary epithelia. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(7): 735–738. DOI: 10.1292/jvms.70.735
- Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 92: 179-85. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00360-7.
- Velázquez, V. O., Vázquez, C.J., Pescador, S.N., Saltijeral, O.J. 2005a. Nivel de células somáticas en leche y resistencia de las vacas lecheras a la mastitis. *Revista de Producción Animal*. 20(207):15-23.
- Velázquez, O.V., Pescador, S.N., Saltijeral, O.J. 2005b. Epidemiología y control de la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras. In: Rodríguez V. R.I., editor: Enfermedades de importancia en la producción animal, México, D.F.: Editorial Mc Graw Hill; 355-377.
- Von Eiff, C., Heilmann, C., Herrmann, M., Peters, G. 1999. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. *Infection*. 27: S7–S10. DOI: 10.1007/BF02561610.
- Zecconi, A., Scali, F. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*. 150: 12– 22. DOI: 10.1016/j.imlet.2013.01.004.