UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS

FORMACIÓN DE BIOFILM DE *Staphylococcus* spp. AISLADOS DE LECHE MASTÍTICA BOVINA DE CULIACÁN, SINALOA Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:
MVZ. Melissa de Jesús Contreras Madueña

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Idalia Enríquez Verdugo

CO-DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

ASESORES:
M.C. Higinio Cepeda Quintero
M.C. Daniel Eduardo Zatarain
M.C. Claudia Leonor Barraza Tizoc

Culiacán, Sinaloa. Agosto de 2025.

Universidad Autónoma de Sinaloa

Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C.P. 80010 Culiacán Sin. Méx.
Tel (667) 713 78 32 y (667) 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profunda gratitud a todas las personas que me acompañaron en esta travesía. A mi familia, especialmente a mi madre, padre y hermano, por su apoyo incondicional y por motivarme siempre a seguir adelante.

De igual manera, extiendo mi eterno agradecimiento a mis mentores: a mi directora de tesis, la Dra. Idalia; a mi co-directora, la Dra. Soila; y a mis asesores, el M.C. Higinio, el M.C. Zatarain y la M.C. Claudia, quienes han sido pilares fundamentales en mi formación académica. De cada uno aprendí valiosas lecciones que espero seguir cultivando a lo largo de mi carrera.

Agradezco también a mis compañeros y amigos, con quienes compartí horas de trabajo en el laboratorio, celebrando los logros y enfrentando juntos las dificultades que acompañaron este proyecto de investigación.

Finalmente, a mi novio Javier, quien ha estado a mi lado en cada momento, brindándome apoyo incondicional aun en las circunstancias más difíciles. Este trabajo es también fruto de su esfuerzo, paciencia y respaldo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS. III
ÍNDICE DE FIGURAS. IV
RESUMEN V
ABSTRACT VI
I. INTRODUCCIÓN. 1
II. ANTECEDENTES. 3
2.1 Mastitis bovina. 3
2.2 Mastitis bovina en México. 4
2.3 Población del ganado vacuno a nivel mundial, nacional y estatal. 5
2.4 *Staphylococcus* spp. 5
2.5 Factores de virulencia de *Staphylococcus* spp. en mastitis. 7
2.5.1 Adherencia. 8
2.5.2 Exotoxinas. 9
2.5.3 Biofilm. 10
2.6 Composición del biofilm. 11
2.7 Formación de biofilm en mastitis bovina. 12
2.8 Biofilm y sus mecanismos patogénicos en mastitis bovina. 13
2.9 Bacterias formadoras de biofilm en mastitis bovina. 14
2.10 Biofilm y resistencia a antibióticos en mastitis bovina. 16
III. HIPÓTESIS. 19
IV. OBJETIVOS. 20
4.1 General. 20
4.2 Específicos. 20
V. MATERIAL Y MÉTODOS. 21
5.1 Descripción del área de estudio. 21
5.2 Diseño del estudio. 21
5.3 Definición de la población. 21
5.5 Procesamiento de muestras para detección de formación de biofilm fenotípicamente – Agar CRA. 22
Figura 3. Escala colorimétrica adoptada para la evaluación de colonias en CRA. 23
5.6 Cuantificación de la formación de biofilm. 23
5.7 Perfil de resistencia a antibióticos de los aislados de *Staphylococcus* spp. 24

5.8 Categorización de los niveles de formación de biofilm (PB) a partir de valores de densidades ópticas (DO). 24

5.9 Evaluación de la relación entre los niveles de formación de *biofilm* de *Staphylococcus* spp. con la resistencia a antibióticos. 25

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 26

VII. CONCLUSIÓN. 40

VIII. PERSPECTIVAS. 41

IX. LITERATURA CITADA. 42

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Principales patógenos causantes de mastitis bovina y su capacidad para formar biofilm. 15
Cuadro 2. Capacidad de formación de biofilm en *S. aureus.* 28
Cuadro 3. Capacidad de formación de biofilm en ECN. 29
Cuadro 4. Cuantificación de formación de biofilm en *S. aureus.* 32
Cuadro 5. Cuantificación de formación de biofilm en ECN. 33
Cuadro 6. Perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de 33
Cuadro 7. Perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de ECN. 34

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Representación esquemática de los factores de virulencia de *S. aureus* y su papel en la patogénesis de la mastitis. 8
Figura 2. Ciclo de formación del biofilm. 13
Figura 3. Escala colorimétrica para la evaluación de colonias en CRA. 23
Figura 4. Evaluación de colonias en CRA.. 26
Figura 5. Capacidad de formación de biofilm en *Staphylococcus* spp. por CRA. 29
Figura 6. Nivel de formación de biofilm en cepas de *S. aureus* y ECN. 31
Figura 7. Distribución de la formación de biofilm con relación a la resistencia antibiótica. 36
Figura 8. Relación entre el grado de resistencia y la formación de biofilm de los aislados de *Staphylococcus* spp. 38

RESUMEN

FORMACIÓN DE BIOFILM DE *Staphylococcus* spp. AISLADOS DE LECHE MASTÍTICA BOVINA DE CULIACÁN, SINALOA Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

MELISSA DE JESÚS CONTRERAS MADUEÑA.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es el principal patógeno asociado a infecciones intramamarias en rumiantes y destaca por su alta capacidad para formar biofilm, lo que dificulta su eliminación y favorece infecciones persistentes. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de formación de *biofilm* de *Staphylococcus* spp. aislados de leche mastítica bovina de Culiacán, Sinaloa, y su relación con la resistencia a antimicrobianos. Se analizó la formación de biofilm de 28 cepas de *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos (ECN), utilizando el método cualitativo de Agar Rojo Congo (CRA; por su siglas en inglés) y el método de semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta al 0.5 %. La asociación entre formación de biofilm y resistencia antimicrobiana se evaluó mediante la prueba de correlación de Spearman. El 75.00% (21/28) de los aislados fueron formadores de biofilm, predominando las cepas débilmente formadoras (60.71 %), seguidas por las moderadas (10.71 %) y fuertes (3.57 %). En *S. aureus*, el 53.33 % fueron formadoras débiles con alta resistencia a cefotaxima y cefalotina (62.50 %). La única cepa fuertemente formadora fue resistente a penicilina, ampicilina y eritromicina. En ECN, también predominaron las formadoras débiles (69.23 %), con resistencia a ampicilina (55.55 %) y cefalosporinas (44.44 %). El estudio demostró que *S. aureus* (73.33%) y los ECN (79.92%) tienen una alta capacidad de formar biofilm y perfiles de resistencia antimicrobiana diversos, incluyendo cepas multirresistentes a antimicrobianos (MDR; por sus siglas en inglés). No se encontró asociación significativa entre resistencia y formación de biofilm, sugiriendo que esta última depende de otros factores de virulencia. Estos hallazgos evidencian un riesgo terapéutico y la necesidad de explorar alternativas para el control de infecciones intramamarias.

Palabras clave: Mastitis bovina, *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, ECN, Biofilm, Resistencia antibiótica.

ABSTRACT

BIOFILM FORMATION OF *Staphylococcus* spp. ISOLATED FROM BOVINE MASTITIC MILK IN CULIACÁN, SINALOA, AND ITS RELATIONSHIP WITH ANTIBIOTIC RESISTANCE

MELISSA DE JESÚS CONTRERAS MADUEÑA.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is the main pathogen associated with intramammary infections in ruminants, characterized by its high biofilm-forming ability, which hinders its elimination and promotes persistent infections. This study aimed to determine the biofilm-forming capacity of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitic milk in Culiacán, Sinaloa, and its relationship with antimicrobial resistance. Biofilm formation of 28 strains of *S. aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) was analyzed using the qualitative Congo Red Agar (CRA) method and the semiquantitative microtiter plate method with 0.5% crystal violet. The association between biofilm formation and antimicrobial resistance was evaluated using Spearman's correlation test. A total of 75.00% (21/28) of the isolates were biofilm producers, with weak producers being the most prevalent (60.71%), followed by moderate (10.71%) and strong producers (3.57%). Among *S. aureus*, 53.33% were weak producers with high resistance to cefotaxime and cephalothin (62.50%). The only strong biofilm-forming strain was penicillin, ampicillin, and erythromycin resistant. In CNS, weak producers also predominated (69.23%), showing resistance to ampicillin (55.55%) and cephalosporins (44.44%). The study demonstrated that *S. aureus* (73.33%) and CNS (79.92%) exhibit a high capacity to form biofilm and diverse antimicrobial resistance profiles, including multidrug-resistant strains (MDR). No significant association was found between resistance and biofilm formation, suggesting that the latter depends on other virulent factors. These findings highlight a therapeutic risk and the need to explore alternative strategies to control intramammary infections.

Keywords: Bovine mastitis, *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, CNS, Biofilm, Antibiotic resistance.

I. INTRODUCCIÓN.

En México, la producción de la leche bovina es un sector de suma importancia en la industria ganadera, en el 2022 la producción de leche fue de 13 mil 110 millones 517 mil litros, ubicando a México como uno de los primeros quince países productores de leche a nivel mundial (SIAP, 2022). La principal finalidad de una granja lechera es la producción eficiente de leche, libre de contaminantes e inocua, por ello es esencial una glándula mamaria saludable (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2022). La mastitis es una patología de origen inflamatorio de la glándula mamaria la cual es resultado de la interacción de varios factores asociados con el huésped, bacterias patógenas y el ambiente. La mayoría de los casos de mastitis ocurren en vacas lecheras, por tanto, el tratamiento debe implicar estrategias eficaces e integrales (Fernández *et al.*, 2012). El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es el patógeno principal en las infecciones intramamarias de los rumiantes, a su vez es un alto formador de biofilm, convirtiéndolo en el agente causal más significativo y común de la mastitis bovina (San Martin *et al.*, 2002). Los biofilm protegen a las bacterias de la fagocitosis, antibióticos y los desinfectantes, la capacidad de la bacteria para formar biofilm crea dificultades en la eliminación del patógeno dando lugar a infecciones persistentes (Schönborn *et al.*, 2017). Se ha reportado la existencia de múltiples patógenos además del *S. aureus* con la capacidad de ocasionar mastitis relacionada a la formación de biofilm basándose en pruebas *in vitro; E.coli*, *Streptococcus uberis* (S. *uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) y Estafilococos Coagulasa Negativa (ECN) (Hordofa, 2022). Los casos reportados en la literatura indican una tasa de recuperación del 27.00% en ubres infectadas por *S. aureus* en comparación a la tasa de recuperación de *S. uberis* (64.00 – 81.00%) o con los ECN causantes de mastitis (80.00 – 90.00%) (Hordofa, 2022). En la actualidad los bacterias formadoras de biofilm representan un problema de salud pública, esto, en gran parte por la capacidad de adhesión a las superficies en los equipos de ordeño, volviéndose una fuente de transmisión y contaminación, a su vez pueden colonizar otras superficies (pipas de transporte de leche, contenedores, accesorios de la industria) afectando la producción de

alimentos, inocuidad de la leche y subproductos (Andrews, 2004; Møretrø y Langsrud, 2017; Srey *et al.*, 2013). Es fundamental recalcar que las bacterias del género *Staphylococcus*, en particular *S. aureus*, con frecuencia presentan resistencia a antimicrobianos (RAM; por sus siglas en inglés), a veces de manera simultánea, frente a casi todos los antibióticos existentes (Cheung *et al.*, 2021). Dado que la resistencia antimicrobiana representa un desafío relevante en las infecciones por *S. aureus*, incluidas aquellas que afectan al ganado, la formación de biofilm suele estar asociada con una mayor resistencia a los antibióticos (Zhao *et al.*, 2023). La barrera protectora del biofilm restringe la penetración de las sustancias antimicrobianas, reduciendo su eficacia frente a las bacterias encapsuladas en él. Además, la actividad metabólica modificada de las bacterias en los biofilms y la presencia de células persistentes agravan la tolerancia a los antibióticos (Zhao *et al.*, 2023). Este problema resulta particularmente preocupante en la producción pecuaria, donde el uso de antimicrobianos es generalizado tanto para el tratamiento como para la prevención. Por todo lo anteriormente mencionado es necesario determinar la capacidad de formación de biofilm de *Staphylococcus* spp. aislados de leche mastítica bovina de Culiacán, Sinaloa, y su relación con la resistencia a antimicrobianos.

II. ANTECEDENTES.

2.1 Mastitis bovina.

La mastitis bovina se considera una de las enfermedades más comunes, y con mayor relevancia en la producción lechera, la cual causa pérdidas económicas significativas en el ganado de leche y de doble propósito del mundo (Abebe *et al.,* 2016; Khasapane *et al.,* 2023; Pineda-Burgos *et al.,* 2024). Se caracteriza por ser una patología intramamaria de origen multifactorial, los cuales incluyen; presencia del agente patógeno *S. aureus*, así como factores ambientales y de manejo, especialmente durante el proceso de ordeña. Estos factores resultan determinantes en la prevalencia de la mastitis, una enfermedad reconocida a nivel mundial por generar considerables pérdidas económicas tanto para los productores como para la industria ganadera (San Martin *et al.,* 2002).

A nivel global, la mastitis subclínica se presenta con mayor frecuencia en los hatos lecheros, se reportó una prevalencia global de aproximadamente 45.00%, ocasionando pérdidas económicas aproximadas de 35 mil millones de pesos al año, representando el 26.00% de los costos derivados de enfermedades. (Acosta *et al.,* 2017; Krishnamoorthy *et al.,* 2021; Pineda-Burgos *et al.,* 2024). Por otro lado, Insua *et al.* (2008) señalan una reducción en la producción de leche la cual oscila entre 770 - 725 litros anuales, además de provocar daños en la glándula mamaria. Así mismo, la leche contaminada conlleva riesgos para la salud pública debido a la presencia de diversas bacterias con capacidad de causar enfermedades (Téllez *et al.,* 2002). Se han llevado a cabo diversas investigaciones para evaluar el impacto económico respecto a la mastitis principalmente en los países desarrollados, donde la disminución en la producción de leche representa hasta el 70.00% de las pérdidas totales, gastos veterinarios, medicamento y sacrificio de animales enfermos (Duarte *et al.,* 2015; Cheng y Han, 2020).

S. aureus es el patógeno principal en las infecciones intramamarias de los rumiantes, convirtiéndolo en el agente causal más significativo y común de la mastitis bovina. Su relevancia radica en la producción de infecciones crónicas, persistentes y recurrentes, esto se debe a su capacidad de superar todas las

barreras del sistema de defensa del huésped, debido a los diversos factores de virulencia como la producción de enzimas, antígenos, adhesinas y toxinas (Dorneles *et al.*, 2019).

2.2 Mastitis bovina en México.

En México, las pérdidas ocasionadas por mastitis subclínica se estiman de la siguiente manera, valor de la producción láctea pérdida (70.00%), valor de las vacas pérdidas por eliminación prematura (14.00%), valor de la leche degradada o desechada (7.00%) y tratamientos y gastos veterinarios (8.00%) (Bedolla y Ponce de León, 2008). En el estudio económico respecto a la lechería familiar realizado en Hidalgo, Vargas-Monter *et al.*, (2021) reportaron pérdidas por mastitis subclínica, en la producción de leche por vaca/día de 2.40 litros y a 732.00 litros por lactancia. Para el caso de la mastitis clínica se reportan pérdidas de producción de 0.64 litros por vaca/día y de 195.20 litros por lactancia. Las pérdidas por mastitis subclínica y clínica fueron 938.20 litros por lactancia/vaca, que en términos económicos corresponde a $6,397.70 por vaca al año. En este estudio se considera que el 73.30% de las pérdidas económicas se generan por la disminución en la producción de leche (Vargas-Monter *et al.*, 2021). Pech *et al.*, (2007) realizaron un estudio, en la zona centro de Yucatán con la finalidad de determinar las pérdidas económicas que ocasiona la mastitis en esa zona, demostrando que se generaba una pérdida por animal de $16,200 por concepto de la disminución en la producción, $750 por gastos en biológicos y $313 por concepto de mano de obra extra. Además, otro aspecto importante son las pérdidas por costos para la prevención y control de mastitis subclínica bovina, este valor oscila entre $1,700 – 2000 anuales por vaca al año (Wolter *et al.*, 2004; Vargas-Monter *et al.*, 2021).

En el país, la mastitis bovina representa un desafío importante tanto para la salud del ganado como para la salud pública, dada su elevada prevalencia (40%) y la complejidad asociada a la implementación de tratamientos efectivos (Mera *et al.*, 2017; Pinelli *et al.*, 2022; Pineda-Burgos *et al.*, 2024). Por otra parte, Brisuela *et al.* (2018) realizaron un estudio en Baja California, donde aislaron e identificaron las especies de bacterias de casos de mastitis bovina subclínica, determinando una

frecuencia del 51.5% (163/316 muestras) siendo los agentes causales más frecuentes *S. aureus* 58.8% (107/182 aislados), *S. agalactiae* 13.2% (24/182), *Staphylococcus chromogenes* 8.8% (16/182), *Escherichia coli* (*E. coli*) 2.2% (4/182) y *S. uberis* 2.2% (4/182).

2.3 Población del ganado vacuno a nivel mundial, nacional y estatal.

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA; por sus siglas en inglés) (USDA, 2025), la población mundial de ganado vacuno alcanza los 923.80 millones de cabezas. India encabeza la lista con 307.50 millones de vacas, seguida por Brasil con 186.90 millones y China con 104.90 millones, concentrando en conjunto aproximadamente el 64.00% del total global.

En los siguientes puestos a nivel mundial se encuentran la Unión Europea (71.80 millones), Argentina (52.40 millones), Australia (27.30 millones), México (18.00 millones), Rusia (17.10 millones), Uruguay (11.80 millones) y Canadá (10.90 millones). El resto del mundo suma 28.6 millones de cabezas, representando apenas el 4.00% del total mundial (USDA, 2025). Cabe destacar que Uruguay posee el mayor número de bovinos per cápita, con 3.60 vacas por habitante (Lasserre *et al.*, 2018), y dedica aproximadamente el 75.00% de su territorio nacional a la producción ganadera (Caffarena *et al.*, 2020).

De acuerdo con el Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado (SADER, 2024; SINIIGA, 2024), la población de ganado en México asciende a 36.30 millones de cabezas. Veracruz ocupa el primer lugar con 2.46 millones de bovinos, seguido por Jalisco con 2.08 millones y chihuahua con 1.66 millones. Sinaloa se encuentra en el 7mo lugar nacional donde se registra una población de 675,674 animales destinados a la producción.

2.4 *Staphylococcus* spp.

Los *Staphylococcus* son cocos no móviles, anaerobios facultativos (excepto *S. saccharolyticus* y *S. aureus* subsp. *Anaerobius*), que son anaerobios estrictos (Schleifer y Bell, 1958), que crecen formando agrupaciones en racimos similares a

uvas debido a planos de división perpendiculares. Bioquímicamente, pueden ser positivos, negativos o variables para la coagulasa; son negativos para la oxidasa, y positivos para la tinción de Gram (Schleifer y Bell, 1958; Garrity *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 2019).

Los *Staphylococcus* pueden sobrevivir en el ambiente durante periodos prolongados (Neely y Maley, 2000; Wagenvoort *et al.*, 2000). Generalmente son catalasa-positivos, aunque se han reportado cepas raras catalasa-negativas (Över *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2015).

Algunas especies del género producen coagulasa (Coa) y/o una proteína fijadora del factor de von Willebrand (vWbp; por sus siglas en inglés), ambas capaces de unirse a la protrombina y convertirla en un complejo que transforma el fibrinógeno en fibrina (Loeb, 1903; Bjerketorp *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2010).

S. aureus coagulasa-positivo se considera una especie altamente patógena (Schleifer y Bell, 1958; Quinn *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2015), mientras que los estafilococos coagulasa-negativos (ECN) son clasificados como patógenos menores (Quinn *et al.*, 2011).

Aunque la mayoría de las especies de *Staphylococcus* coagulasa-positivas asociadas a mastitis bovina corresponden a *S. aureus* (Fox y Hancock, 1989), otras especies coagulasa-positivas o con coagulasa variable no pertenecientes a *S. aureus* pueden causar ocasionalmente mastitis y otras enfermedades en animales, incluyendo bovinos lecheros. *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. coagulans* son especies coagulasa-positivas que provocan diversas enfermedades en perros y gatos, y en ocasiones, casos esporádicos de mastitis bovina (Devriese *et al.*, 2005; Bannoehr *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007).

Por otro lado, algunas especies de ECN como *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* y *S. epidermidis* (Pyörälä y Taponen, 2009; Wald *et al.*, 2019; De Buck *et al.*, 2021) se reportan cada vez con mayor frecuencia como agentes causales de mastitis subclínica, y en algunos casos, de mastitis clínica en

bovinos lecheros (Pyörälä y Taponen, 2009; Jenkins *et al.*, 2019; De Buck *et al.*, 2021).

Los ECN comprenden un grupo diverso de especies que varían en su patogenicidad, distribución epidemiológica y composición genómica. Describir cada especie individualmente y estudiar su virulencia, patogenicidad, distribución, efecto sobre el recuento de células somáticas (RCS) en la leche y las pérdidas en la producción lechera resulta más útil para el control de la mastitis causada por este grupo bacteriano.

2.5 Factores de virulencia de *Staphylococcus* spp. en mastitis.

Se ha demostrado que muchas clases de factores de virulencia excretados por cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis favorecen la supervivencia y proliferación bacteriana dentro de la glándula mamaria (Figura 1). Estos factores de virulencia están regulados principalmente por un sistema regulador accesorio de detección de *quórum* (agr; por sus siglas en inglés), cuya expresión se correlaciona con la virulencia y patogenicidad bacteriana (adhesión, exotoxinas y biofilm) (Rossi *et al.*, 2021).

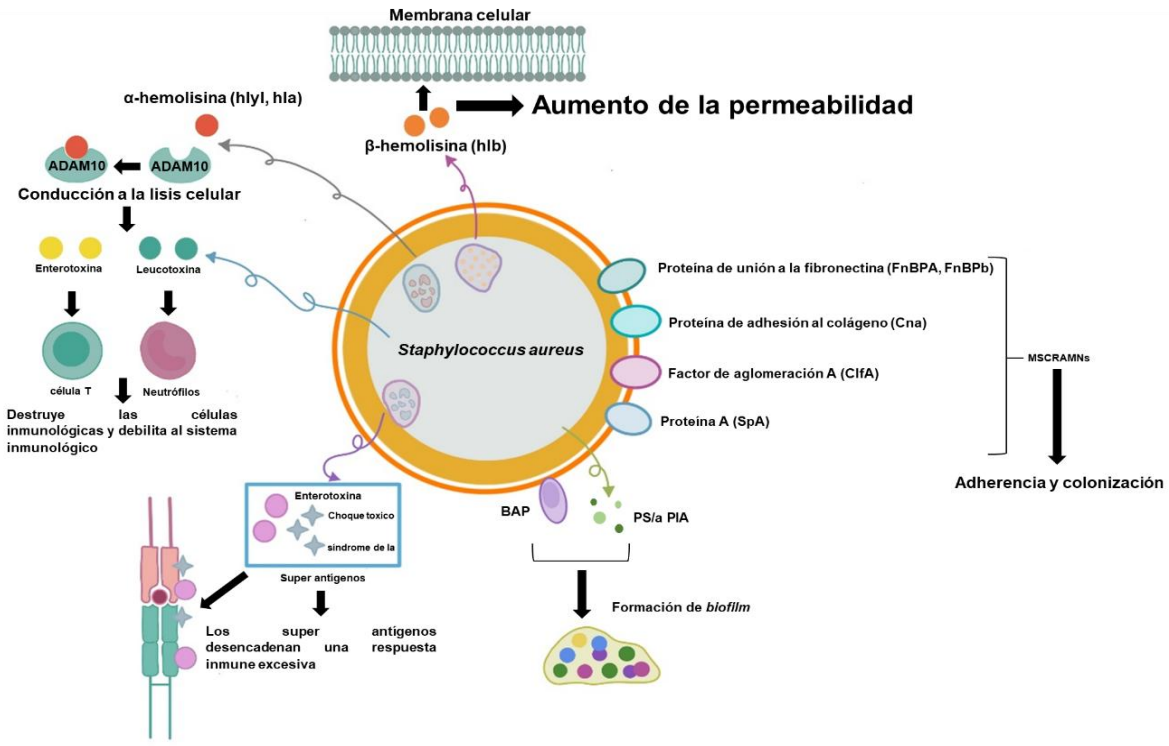


Figura 1. Representación esquemática de los factores de virulencia de *S. aureus* y su papel en la patogénesis de la mastitis. *S. aureus* expresa una variedad de proteínas de superficie celular denominadas MSCRAMMs; por sus siglas en inglés., que favorecen su adherencia y colonización de los tejidos del hospedador. Estas incluyen proteínas de unión a fibronectina (codificadas por FnBPA y FnBPB), proteína de adhesión al colágeno (codificada por *Cna*), factores de aglutinación (codificados por clfA) y la proteína A (codificada por *SpA*). La α-hemolisina interactúa con ADAM10, y la β-hemolisina incrementa la permeabilidad de la membrana celular, contribuyendo a la lisis celular. Los superantígenos (SAgs), entre ellos las enterotoxinas y la toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1), inducen respuestas inmunitarias exageradas. Por el contrario, las leucotoxinas (codificadas por *LukED* y *LukMF*) atacan y destruyen células inmunitarias, debilitando así las defensas del hospedador. *S. aureus* también secreta *Bap*, polisacáridos capsulares/adesinas (PS/A; por sus siglas en inglés) y adhesina polisacárido intercelular (PIA; por sus siglas en inglés), moléculas que promueven la formación de biofilm, facilitando su supervivencia en distintos entornos. Adaptado de (Tong *et al.*, 2025).

2.5.1 Adherencia.

La adhesión a las células epiteliales mamarias bovinas (bMECs; por sus siglas en inglés) es un mecanismo clave en la patogénesis de la mastitis causada por *S. aureus* (Pereyra *et al.*, 2016). Esta bacteria utiliza diversos MSCRAMMs, como FnBPA, FnBPB, ClfA, Cna y SpA, para colonizar las bMECs (Artursson *et al.*, 2016; Ashraf *et al.*, 2017). Estas proteínas, ancladas a la pared celular, comparten dominios estructurales que les permiten unirse a ligandos y fijarse al peptidoglucano mediante una señal en el extremo C-terminal (Foster *et al.*, 2014).

FnBPA y FnBPB son esenciales para la adhesión e invasión en la glándula mamaria, ya que su ausencia reduce la colonización en modelos murinos (Brouillette *et al.*, 2003), y la sobreexpresión de *fnbB* se ha asociado con mayor capacidad invasiva hacia bMECs (Pereyra *et al.*, 2016). No obstante, la invasividad persiste incluso sin estos genes, lo que sugiere la participación de otros factores (Castilho *et al.*, 2017). El gen *clfA* presenta una alta prevalencia (63.70 – 100%) en cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos lecheros (Klein *et al.*, 2012), y su producto proteico se adhiere a las bMECs de manera independiente del fibrinógeno mediante el receptor de membrana A2 (Ashraf *et al.*, 2017).

En los ECN, las proteínas ancladas a la pared celular (CWA; por sus siglas en inglés) se clasifican en dos familias: (i) los MSCRAMMs, que incluyen las proteínas Sdr y Ses; y (ii) las proteínas con repeticiones G5-E, como Aap (Ortega-Peña *et al.*, 2020). Los MSCRAMMs poseen dominios tipo IgG que permiten la unión estable al

ligando mediante el mecanismo de “acoplar, bloquear y asegurar” (“dock, lock and latch”), fundamental bajo fuerzas de cizallamiento como las presentes alrededor de dispositivos médicos implantados (Ponnuraj *et al.*, 2003).

Además, se han identificado proteínas CWA no clasificadas, como Bhp, posiblemente implicadas en la formación de biofilm (Ortega-Peña *et al.*, 2020). También se reconocen adhesinas ancladas de forma no covalente como AtlE y Aae, y componentes no proteicos como los ácidos teicoicos (TAs) y PIA, todos ellos relacionados con la adhesión y formación de biofilm (Heilmann, 2011; Foster *et al.*, 2014; Paharik y Horswill, 2016; Ortega-Peña *et al.*, 2020).

2.5.2 Exotoxinas.

Cuando *S. aureus* se adhiere a las bMECs, libera diversas exotoxinas que destruyen el tejido y provocan una respuesta inflamatoria. Entre las más relevantes se encuentran las hemolisinas, enterotoxinas, la toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1) y las leucotoxinas (Abril *et al.*, 2020).

S. aureus produce comúnmente α- y β-hemolisinas. La α-hemolisina (Hla) se une al receptor de membrana ADAM10, lo que induce un aumento en los niveles intracelulares de calcio (Ca^{2+}) y una disminución rápida del potasio (K^{+}), contribuyendo a la disrupción celular. Por otro lado, la β-hemolisina, aunque no causa lisis celular directa, actúa como una esfingomielinasa que incrementa la permeabilidad de las células hospedadoras y provoca una pérdida progresiva de carga en la membrana, haciéndolas más susceptibles a la acción de la α-hemolisina (Huseby *et al.*, 2007).

Las enterotoxinas estafilocócicas están reguladas por múltiples genes y son frecuentes en cepas clínicas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina. Su distribución genética se ha relacionado con el tipo de manifestación clínica. En este sentido, los genes *seh* y *sek* son más prevalentes en aislamientos asociados a mastitis subclínica, mientras que los genes *sed* y *sej* se relacionan principalmente con casos de mastitis persistente (Haveri *et al.*, 2007).

En el caso de los ECN, también se han identificado diversas exotoxinas, tales como la leucocidina de Panton–Valentine, la toxina exfoliativa A, la enterotoxina S, la estafilocinasa y el inhibidor del complemento estafilocócico, factores de virulencia que podrían desempeñar un papel relevante en su patogénesis (Xia y Wolz, 2014).

2.5.3 Biofilm.

La formación de biofilm de *S. aureus* implica una variedad de proteínas y genes, incluidos los PS/a y las PIA (Vasudevan et al., 2003). Estudios han demostrado que el locus ica (icaABCD), que sintetiza PS/a y PIA, es altamente prevalente en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina (Vasudevan et al., 2003). Sin embargo, otras investigaciones han encontrado que la interrupción del operón ica en cepas de *S. aureus* positivas para *Bap*, también aisladas de mastitis bovina, no afectó la formación de biopelículas *in vitro*, lo que sugiere que la proteína de superficie Bap compensa la ausencia de los productos PIA/PNAG (poli-β (1–6)-N-acetilglucosamina) (Cucarella et al., 2004). También podrían existir otros factores aún no descubiertos relacionados con la formación de biofilm que participen o contribuyan a este mecanismo compensatorio, y esta posibilidad merece una investigación más profunda.

A concentraciones bajas de calcio, *Bap* se fragmenta en porciones que forman fibrillas amiloides, las cuales proporcionan un andamiaje estructural para el desarrollo del biofilm (Taglialegna *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que *S. aureus* de origen bovino forma biopelículas de manera dependiente de PIA durante la lactancia, pero el mecanismo independiente de PIA mediado por *Bap* podría desempeñar un papel durante el período seco, cuando las concentraciones de calcio en la ubre son bajas. También se ha observado que *Bap* facilita la formación de bMECs, al debilitar la internalización bacteriana mediante su interacción con Gp96, una proteína expresada en dichas células (Valle *et al.*, 2012). En este contexto, la matriz polimérica extracelular (EPM; por sus siglas en inglés), mediada por *Bap* promueve el establecimiento de infecciones persistentes a largo plazo y facilita la evasión del sistema inmunológico al enmascarar los antígenos de superficie (Valle *et al.*, 2012).

La capacidad de los ECN para formar biofilm se considera un importante factor de virulencia y, por lo tanto, los mecanismos subyacentes a este proceso han cobrado especial atención en las últimas décadas. Las adhesinas asociadas a la superficie desempeñan un papel clave tanto en la adhesión inicial a proteínas y tejidos del hospedador como en la maduración de biofilm. Estas adhesinas comprenden proteínas ancladas de forma covalente y no covalente, así como factores no proteicos (Heilmann, 2011; Foster *et al.*, 2014; Paharik y Horswill, 2016; Ortega-Peña *et al.*, 2020). Las proteínas CWA se caracterizan por la presencia del motivo LPXTG, que es reconocido por la enzima sortasa, la cual se encarga de llevar a cabo el proceso de anclaje de la proteína al peptidoglicano (Dramsi Y Bierne, 2017).

2.6 Composición del biofilm.

El biofilm es una comunidad multicelular de bacterias, unidas por una EPM, con diversidad genética y variabilidad en la expresión de genes (fenotipo), la cual ocasiona infecciones crónicas; las células microbianas se adhieren entre si a una superficie inerte o viva (Flemming *et al.*, 2016; Haesler *et al.*, 2019). La EPM se forma en la etapa de unión de los biofilm a una superficie. Si se formara una biopelícula microbiana sobre una superficie inerte o viva es la consecuencia de la formación de una EPM, la cual proporciona fuerza a la interacción de los microrganismos dentro del biofilm (Miron *et al.*, 2001; Branda *et al.*, 2005).

Generalmente el espesor de la EPM es de 0.2 – 1.0 µm, mientras, el espesor del biofilm no supera los 10 – 30 µm (Pereira *et al.*, 2022). Normalmente entre el 5.00 – 35.00% del volumen del biofilm está conformado por microorganismos mientras en el volumen restante se encuentra la EPM. La cual está compuesta mayoritariamente de proteínas (Sun *et al.*, 2005). Algunos nutrientes y minerales relevantes quedan atrapados por el entorno el cual los rodea, por medio del sistema de eliminación, creado por la EPM (Costerton *et al.*, 1994). La EPM presenta diferentes tipos de componentes: sustancias poliméricas; proteína mayoritariamente (>2.0%); otros constituyentes, como polisacáridos (1.0 – 2.0%); moléculas de ADN (<1.0%), ARN (<1.0%); iones (ligados y libres), finalizando con el 97.00% de agua. El flujo de

nutrientes esenciales dentro de una biopelícula se atribuye al elevado contenido de agua (Sutherland, 2001; Lu y Collins, 2007).

2.7 Formación de biofilm en mastitis bovina.

La formación de biofilm es proceso dinámico y cíclico que consisten en 5 etapas; motilidad y adhesión, formación de microcolonias, maduración y dispersión bacteriana. Las bacterias planctónicas buscan una superficie a la cual adherirse a través del movimiento Browniano, hidrodinámico y la natación activa. También utilizan sus propios *pili,* se adhieren con sus flagelos, ejercen acción electrostática, hidrofóbica, además de otras acciones fisicoquímicas para favorecer una mejor adhesión a las superficies de fijación (Sutherland, 2001). Cuando la adhesión es estable, el sistema de comunicación entre bacterias *Quorum Sensing* (QS; Por sus siglas en inglés) es activado. Por medio del Sistema QS, moléculas de señales químicas son transmitidas para regular la proliferación y división bacteriana, así mismo como la densidad. La formación de EPM ocurre en la etapa de adhesión del biofilm a una superficie proporcionando fuerza para la interacción de las bacterias dentro del biofilm (Branda *et al.,* 2005).

La EPM es un componente clave de la matriz debido a su adherencia a los sustratos y el biofilm indispensables para mantener su estructura. La EPM actúa como puente hacia bacterias cargadas negativamente a superficies cargadas positivamente. La transición de una sola célula dentro de un grupo de células necesita desarrollarse por medio de la intercomunicación para coordinar el crecimiento y maximizar la eficiencia. Con la etapa final los biofilm llevan a cabo una separación celular, al separarse las células desactivan los genes codificadores de la EPM, comenzando a regular los genes que codifican; proteínas quimiotácticas o los flagelos requeridos por las bacterias planctónicas (Ma *et al.,*2009).

Etapas de la formación del biofilm.

El desarrollo del biofilm, representado como un proceso de cinco etapas se muestra a continuación (Figura 2).

1. Las bacterias colonizadoras se anclan a una superficie mediante técnicas básicas de adhesión (Donlan, 2002).

2. Después de que las células se unen, forman microcolonias y excretan EPM o "*slime*" para formar una adhesión irreversible que puede resistir las fuerzas de corte y mantener un agarre firme en la superficie (Kjelleberg y Givskov 2007).
3. El biofilm está completamente formado. A medida que madura, el biofilm se convierte en un grupo multicapa (Guzmán-Soto *et al.*, 2021).
4. El biofilm continúa creciendo y adquiriendo una forma tridimensional. A medida que madura, el biofilm es capaz de proporcionar protección contra el sistema inmunológico del huésped, agentes antimicrobianos, desinfectantes y antibióticos (Webb, 2009).
5. La separación de las células microbianas es consecuencia de ciertas enzimas microbianas que descomponen la matriz polimérica extra, lo que resulta en la dispersión de las células microbianas y permite que las bacterias colonicen nuevas superficies (Hordofa, 2022).

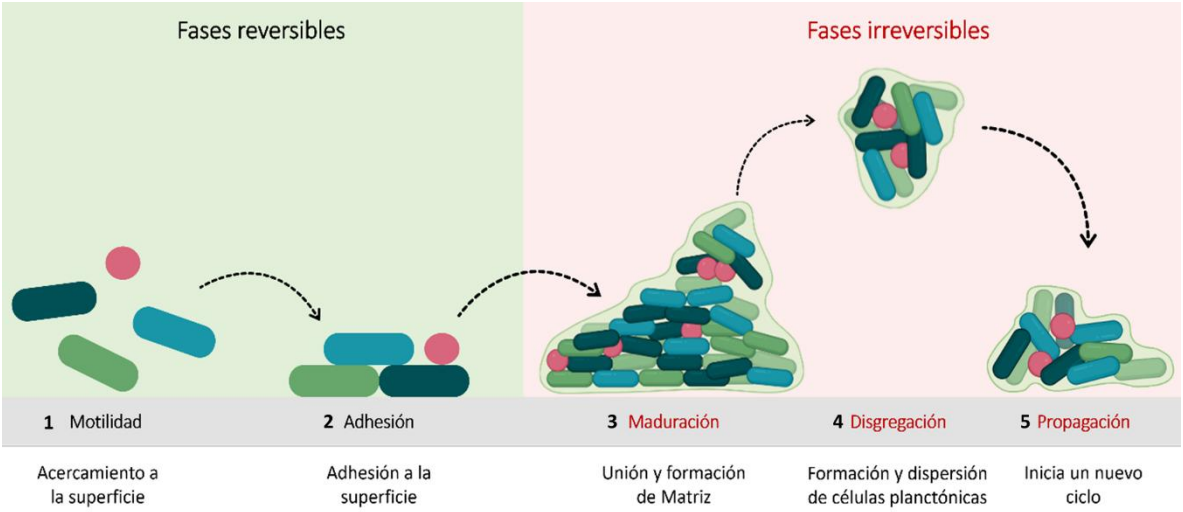


Figura 2. Ciclo de formación del biofilm: (1) Acercamiento a superficie/motilidad; (2) adhesión a la superficie; (3) Unión y formación de Matriz/maduración; (4) Formación y dispersión de células planctónicas y (5) Inicio de un nuevo ciclo/propagación. Adaptado de (Olanbiwoninu y Popoola, 2023).

2.8 Biofilm y sus mecanismos patogénicos en mastitis bovina.

Las enfermedades causadas por bacterias formadoras de biofilm están asociados con la formación de biofilm en la superficie del tejido enfermo junto con la liberación continua de bacterias, ocasionando infecciones persistentes e inflamación crónica. Las características estructurales y propiedades del biofilm bacteriano las hacen menos susceptibles que a las bacterias planctónicas frente a los antibióticos y al sistema inmunológico (Hordofa, 2022).

La habilidad de colonizar (adherirse) e invadir el epitelio de la glándula mamaria ayuda a la bacteria para evadir la respuesta del sistema inmunológico e infectar de manera persistente. A su vez exhiben una mayor motilidad al igual que mayor virulencia (Kumar *et al.*, 2017). La adherencia a las superficies depende de las proteínas de adhesión, las cuales ayudan a las bacterias a reconocer y unirse a las células huésped. La EPM de las bacterias formadoras de biofilm se vuelven más resistentes a varias sustancias químicas con actividad antimicrobiana producida por células, a su vez protegiéndolas del sistema inmune innato (Lasa, 2006).

También las bacterias se encuentran recubiertas por una amplia variedad de proteínas superficiales, encargadas de ayudar a la adhesión de las bacterias a las células huésped y los componentes de la EPM. Los MSCRAMMs en el huésped son la superficie de proteínas más común involucrada en la adhesión (Atulya *et al.*, 2014).

La degradación de la lactosa en galactosa y glucosa en la leche cruda puede disminuir las concentraciones de glucosa, principal carbohidrato utilizado en el metabolismo bacteriano. Esta reducción genera condiciones de estrés metabólico que estimulan respuestas adaptativas en los microorganismos, entre ellas la producción de biofilm. (Cappitelli *et al.*, 2014).

A su vez el biofilm puede adherirse a las paredes del equipo de ordeño, convirtiéndolo en la principal fuente de contaminación de los productos lácteos, así como la principal fuente de transmisión de la enfermedad (Pedersen *et al.*, 2021).

2.9 Bacterias formadoras de biofilm en mastitis bovina.

La mastitis en bovinos lecheros y de doble propósito es un serio problema para las granjas productoras de leche debido a la disminución en la producción de leche, los elevados costos del tratamiento médico, aunado al aumento de la tasa de sacrificio y mortalidad (Høiby *et al.*, 2010). La capacidad de las bacterias para formar biofilm se considera un importante factor de virulencia en la patogénesis de la mastitis. Esto es debido al tratamiento mayoritario de las infecciones intramamarias con antibióticos (Hordofa, 2022).

Los biofilm protegen a las bacterias de la fagocitosis, antibióticos y los desinfectantes, la capacidad de la bacteria para formar biofilm crea dificultades en la eliminación del patógeno dando lugar a infecciones persistentes (Schönborn *et al.*, 2017). La resistencia a los agentes antimicrobianos es resultado de una difusión retardada de los antibióticos a través de la EPM del biofilm, la cual también contribuye al incremento en la tasa de mutación de las bacterias, la producción de enzimas degradadoras de antibióticos, la presencia de células bacterianas latentes con baja actividad metabólica, además del incremento en los tiempos de duplicación en las capas internas del biofilm (Hordofa, 2022).

En el cuadro 1, se evidencia la existencia de múltiples patógenos además del *S. aureus* con la capacidad de ocasionar mastitis relacionada a la formación de biofilm basándose en pruebas *in vitro; E.coli*, S. *uberis*, *S. dysgalactiae* y ECN. Los casos reportados en la literatura indican una tasa de recuperación menor a 27.00% en ubres infectadas por *S. aureus* en comparación a la tasa de recuperación de *S. uberis* (64.00 – 81.00%) o con los ECN causantes de mastitis (80.00 – 90.00%) (Hordofa, 2022).

Cuadro 1. Principales patógenos causantes de mastitis bovina y su capacidad para formar biofilm.

Patógenos	Grado de mastitis	Capacidad de formar biofilm	Referencias
S. aureus	Subclínica	+	(Darwish y Asfour, 2013; Fabres *et al., 2015*)
ECN	Subclínica	+	(Darwish y Asfour, 2013; Ruegg y Pantoja, 2013)
E. coli	Clínica	+	(Costa *et al.*, 2014)
Enterococcus faecalis	Clínica	+	(Elhadidy y Zahran, 2014)
S. uberis	Clínica	+	(Kromker, 2014)
S. dysgalactiae	Clínica	+	(Olson *et al.*, 2002)
S. agalactiae	Clínica	+	(Rosini y Margarit, 2015)

+: Bacteria formadora de biofilm

Adaptado de (Hordofa, 2022).

2.10 Biofilm y resistencia a antibióticos en mastitis bovina.

Las bacterias que se encuentran dentro del biofilm son más resistentes a los antibióticos en comparación a las bacterias planctónicas. Se ha estimado que las bacterias formadoras de biofilm pueden ser 1000 veces más resistentes que las bacterias planctónicas. Es altamente probable que múltiples factores estén coaccionando para proteger a las bacterias dentro del biofilm de la terapia antibiótica (Boyen *et* al., 2009; Fernandes *et al.*, 2011; Varhimo *et al.*, 2011; Simojoki *et al.*,2012; Elhadidy y Elsayyad, 2013).

Así mismo, la EPM previene la penetración del antibiótico dentro del biofilm. Los polisacáridos cargados junto con el ADN de la matriz pueden atrapar varios tipos de antibióticos. Eso se debe a la lenta tasa crecimiento de las bacterias presentes, baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes dentro del biofilm especialmente en las capas más profundas del mismo (Hordofa, 2022). Todas estas características vuelven a las bacterias formadoras de biofilm insensibles a los antibióticos que tienen como objetivo las células en división, tal es el caso del antibióticos β-lactámicos, al ser implementados contra *E. coli* formador de biofilm su actividad bacteriolítica es disminuida (Bogni *et al.*, 2011).

En los biofilm existe una pequeña subpoblación de bacterias denominadas persistentes. Su grado de crecimiento es nulo o extremadamente lento. La mayoría de los antibióticos que actúan en esta etapa del crecimiento o división no son efectivos contra las bacterias persistentes (Hordofa, 2022). Por otro lado, las bombas de E-flujo son otro factor importante, esto se debe a la permisión de las bacterias de expulsar toxinas intracelulares, incluyendo a los antibióticos. Las bombas de E-flujo también se presentan en bacterias planctónicas, pero algunos genes de bombas E-flujo son reguladas en el biofilm indicando su contribución a la resistencia de la terapia antimicrobiana (Lewis, 2007).

Los plásmidos con contenido de resistencia antibiótica pueden ser de una especie única o multiespecie, el biofilm puede ser un gen transferido de manera horizontal. En los biofilm la frecuencia con la cual se transmite un plásmido de forma horizontal es mucho mayor en contraste de la transferencia entre bacterias planctónicas.

Estudios llevados a cabo en *S. aureus* han demostrado como el biofilm promueve la diseminación del plásmido con contenido de resistencia antibiótica por medio de la conjugación/movilización (Milanov *et al.*, 2015).

La mayoría de las infecciones intramamarias son tratadas con antibióticos. Los biofilm protegen a los microrganismos contra los antibióticos y la fagocitosis (Bose *et al.*, 2009). Esta habilidad de formar biofilm incrementa las dificultades para la eliminación de los patógenos, lo cual a su vez ocasiona el incremento de infecciones persistentes. La resistencia a los antimicrobianos es resultado, de la unión de otros factores; el efecto retardado de difusión a través de la EPM del biofilm, el incremento de la tasa de mutación, producción de enzimas que degradan al antibiótico, junto con la presencia de bacterias latentes (persistentes) con una actividad metabólica lenta ocasionando un aumento en los tiempos de duplicación de las capas internas del biofilm (Høiby *et al.*, 2010).

Además, Guzmán-Rodríguez *et al.* 2022 analizaron la relación entre el perfil de resistencia a antibióticos y la formación de biofilm de aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina en granjas lecheras en sistemas de producción semi-intensivo y de traspatio en los estados de Guanajuato y Michoacán en México. Se analizaron 30 aislados de *S. aureus* obteniendo un 100% (30/30) resistencia a penicilina y dicloxacilina, seguidos por cefotaxima 86.66% (26/30), ampicilina y cefalotina 83.33% (25/30) y ceftazidima 80.00% (24/30), mientras a oxacilina se presentó una resistencia del 36.66% (11/30). Logrando identificar en todos los aislado de *S. aureus* la capacidad de formar biofilm con un rango del 20.00 – 98.00%. Así mismo los aislados con una multirresistencia elevada presentaron una mayor formación de biofilm; estableciéndose una correlación positiva significativa.

Así mismo, Salinas-Pérez *et al.* 2024 analizaron la capacidad de formación de biofilm de 20 cepas de *S. aureus* MDR aislados de mastitis bovina, reportaron que el 100% de los aislados de *S. aureus* evaluados presentaron capacidad de formar biofilm en distintos grados. Los aislados sensibles a antimicrobianos mostraron porcentajes de formación de biofilm entre 22.50% y 50.80%, mientras que los aislados resistentes presentaron valores más altos, de 42.30% - 88.50%.

Moreno *et al.* (2025), realizaron una investigación en 35 unidades de producción lechera con bovinos que presentaban mastitis clínica y subclínica, logrando clasificar la formación de biofilm de 155 cepas de *S. aureus* de la siguiente manera: 1.93% (3/155) no formadoras de biofilm (NB), 25.16% (39/155) formadoras moderadas (MB), 55.32% (78/155) formadoras débiles (DB) y 21.93% (34/155) formadoras fuertes (FB). En cuanto a las cepas ECN, reportaron 5.55% (2/36) NB, 22.22% (8/36) DB, 30.55% (11/36) MB y 41.66% (15/36) FB.

En un estudio realizado por Eidaroos *et al.* (2025), en granjas privadas en la gobernación de Damietta, Egipto, donde aislaron 40 cepas de *S. aureus* a partir de muestras de leche de bovinos sanos y con mastitis clínica, en el cual todos los aislados FB 100% (26/26) fueron resistentes a ceftriaxona y ceftazidima, y también presentaron altos niveles de resistencia a penicilina, clindamicina y cefoxitina 96.15% (25/26). Asimismo, un alto porcentaje mostró resistencia a eritromicina 88.46% (23/26), seguido por ampicilina-sulbactam 73.07% (19/26).

En otra investigación en 24 unidades de producción lechera de la Universidad de São Paulo, Brasil, Fidelis *et al.* (2024), evaluaron 111 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de bovinos con mastitis clínica y subclínica, entre los aislamientos analizados, mostraron capacidad para formar biofilm, clasificada como fuerte, moderada o débil. En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana, los aislamientos de *S. aureus* presentaron resistencia a penicilina 92.90% (103/111), ampicilina 50.80% (56/111) y tetraciclina 52.70% (59/111). Sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre los patrones de resistencia antimicrobiana y la capacidad de formación de biofilm entre los aislamientos. De manera similar, Francisco *et al.* (2021) evaluaron la relación entre la formación de biofilm y la resistencia a antibióticos en ECN, sin encontrar una correlación significativa entre el fenotipo de formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana.

III. HIPÓTESIS.

Los *Staphylococcus* spp. aislados de leche mastítica bovina de Culiacán, Sinaloa, con resistencia a antibióticos, evidenciarán una mayor capacidad de formación de biofilm, presentando una correlación entre el fenotipo de formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana.

IV. OBJETIVOS.

4.1 General.

Determinar la capacidad de formación de biofilm de *Staphylococcus* spp. aislados de leche mastítica bovina de Culiacán, Sinaloa, y su relación con la resistencia a antimicrobianos.

4.2 Específicos.

1. Determinar la formación de biofilm por el método cualitativo de CRA.
2. Cuantificar la formación de biofilm por la técnica de Microtitulación con Cristal Violeta (MCV) en lector de ELISA.
3. Estimar la relación entre la formación de biofilm de *Staphylococcus* spp. con la resistencia a antibióticos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Descripción del área de estudio.

El municipio de Culiacán se encuentra en el centro del estado de Sinaloa. Colinda al norte con el municipio de Badiraguato, en la zona sur con el Golfo de California, al este con Cosalá y el estado de Durango, al oriente con el municipio de Navolato, en la parte noroeste nuevamente con el estado de Durango, en la parte noroeste nuevamente con Navolato y con Mocorito, al suroeste con Elota y Cosalá y finalmente en la parte suroeste colinda con los municipios de Navolato y con el Golfo de California. Geográficamente se localiza entre las coordenadas 24° 02' 10" y 25° 14' 56" latitud norte y entre 106° 56' 50" y 107° 50' 15" longitud oeste. Está constituido por una extensión territorial de 4,758 kilómetros cuadrados. La región se caracteriza por tener un clima BS1 (h') w(w)(e), se define como clima semiseco, muy cálido, con lluvias en verano, según la clasificación de Köppen y modificada por García (1988) (INEGI, 2021); con temperatura promedio anual de 25.9ºC, máxima de 30.6ºC en junio y julio, y mínima de 20.0ºC en enero; la humedad relativa promedio es de 68.0%, con máxima de 81.0% en septiembre y mínima de 51.0% en abril; la precipitación anual promedio es de 688.5 mm (CIAPAN, 2002).

5.2 Diseño del estudio.

El estudio es correlacional, observacional y descriptivo (Soto y Cvetkovich, 2020).

5.3 Definición de la población.

La población estuvo conformada por 28 cepas de *Staphylococcus spp.*, de las cuales 15 correspondieron a *S. aureus* y 13 a ECN. De estas, 25 presentaron RAM. Las cepas se reactivaron a partir de muestras de leche mastítica previamente obtenidas de bovinos de hatos lecheros y de doble propósito, seleccionados por conveniencia en el municipio de Culiacán, Sinaloa

5.5 Procesamiento de muestras para detección de formación de biofilm fenotípicamente – Agar CRA.

Los aislados fueron caracterizados por medio del CRA tal como lo describió Arciola *et al.* (2002), las placas de CRA fueron preparadas por un compuesto de 1 L de Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI-A; por sus siglas en inglés) – (Condolab ®) añadiendo 0.8 g de rojo Congo - (Fagalab ®) y 36 g de sacarosa - (Grupo Internacional ICR ®), se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Para la identificación de cepas formadoras de biofilm en el CRA, se inocularon las cepas realizando un estriado por agotamiento en cada placa, las placas se incubaron por 24 h a una temperatura de 37°C y, posteriormente, durante toda la noche a temperatura ambiente. Para una evaluación precisa de todas las posibles variaciones cromáticas exhibidas por las colonias cultivadas, se utilizó una escala interna de referencia de seis colores. La escala: Muy Rojo (MR); Rojo (R); Rojo Oscuro (RO); Casi Negro (CN); Negro (N); Muy Negro (MN); Apariencia de la colonia en la placa CRA (B), Grupo 1 – No formadores; Grupo 2 – Débiles formadores y Grupo 3 – Fuertes formadores (Figura 3). Las colonias muy negras y negras se consideran cepas formadoras de biofilm, mientras que los colores oscuros, casi negros, es indicativo de una actividad débil de formación de biofilm. Por el contrario, las colonias con colores de muy rojo hasta rojo/rosa se clasificaron como cepas incapaces de formar biofilm. En algunos casos aparecieron formadoras intermedias de color rosa, dentro de 48 h el centro de la colonia adquirió un color negro, estas pequeñas colonias ya sean de color rosa o negro, fueron sub-cultivadas de nuevo en el CRA durante 24 h para obtener las variantes de los aislados puros (cepas formadoras y no formadoras de biofilm) (Freeman *et al.*, 1989; Arciola *et al.*, 2005).

Escala de referencia (A)	Descripción - Grupo 1:
Muy Rojo (MR) 	En el medio CRA, las colonias exhiben una coloración que oscila de MR a R característica asociada a cepas no formadoras de biofilm.
Rojo (R) 	

<table>
<tr><td colspan="2">Grupo 2:</td></tr>
<tr><td>Grupo 2: Rojo Oscuro (RO)

Grupo 2: Casi Negro (CN)
</td><td>En el medio CRA, las colonias exhiben una coloración que oscila de RO a CN característica asociada a cepas débiles formadoras de biofilm.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Grupo 3:</td></tr>
<tr><td>Grupo 3: Negro (N)

Grupo 3: Muy Negro (MN)
</td><td>En el medio CRA, las colonias exhiben una coloración que oscila de N a MN característica asociada a cepas fuertes formadoras de biofilm.</td></tr>
</table>

Figura 3. Escala colorimétrica para la evaluación de colonias en CRA.

5.6 Cuantificación de la formación de biofilm.

La capacidad de los aislados para formar biofilm fue medida en placas estériles de microtitulación de 96 pocillos (Kouidhi *et al.*, 2010). Cada cepa se sembró en placas de agar BHI a 37°C por 24 h, para su posterior inoculación en Caldo Soya Tripticaseína estéril (TSB; por sus siglas en inglés), los crecimientos se ajustaron a una concentración 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). En placas de microtitulación se midieron 28 cepas de *Staphylococcus* spp., control positivo *S. aureus* ATCC 25923 y control negativo solo TSB, por triplicado, con 196 µL de TSB enriquecido con glucosa al 0.25% y 4 µL de suspensión bacteriana o controles, se incubaron a 37°C por 48 h. A continuación, se desechó el TSB (sobrenadante), se realizaron 2 lavados con 200 µL de solución salina tamponada con fosfato (1x) (PBS; por sus siglas en inglés) de esta manera se removieron las bacterias planctónicas. Las bacterias adheridas se fijaron con etanol al 95.0% durante 5 min; posteriormente se desechó el sobrenadante, dejando secar la placa durante 15 min.

Acontinuación, a cada pozo se adicionaron 200 µl de solución de cristal violeta 0.5% y se incubó a 37°C por 15 min. Después se desecharon los 200 µL de colorante, para realizar 2 lavados con PBS (1x) y desechando el sobrenadante. Se añadieron 150 µL de etanol 95%, se realizaron 3 réplicas y 3 repeticiones por cepa. Se tomó la lectura de la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA - espectrofotómetro (Biotek Elx800). 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) (García *et al.*, 2019).

5.7 Perfil de resistencia a antibióticos de los aislados de *Staphylococcus* spp.

Se realizó un antibiograma por triplicado para cada cepa mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, utilizando sensidiscos PT-34N Multibac I.D. Se emplearon los siguientes antibióticos y concentraciones: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), clindamicina (30 µg), dicloxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 U), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg) y vancomicina (30 µg).

Los resultados se interpretaron como sensibles, intermedios o resistentes, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024) y del fabricante Investigación Diagnóstica Laboratorio de Reactivo para Diagnóstico (ID, 2020).

Con base en el perfil de resistencia, los 28 aislados se clasificaron en cuatro grupos:

- Grupo 1: Sin resistencia (0 antibióticos).
- Grupo 2: Resistencia baja (1 – 3 antibióticos).
- Grupo 3: Resistencia media (4 – 7 antibióticos).
- Grupo 4: Resistencia alta (8 – 11 antibióticos).

5.8 Categorización de los niveles de formación de biofilm (PB) a partir de valores de densidades ópticas (DO).

Con base en las mediciones de absorbancia (ABS), las 28 cepas se clasificaron en cuatro categorías según su capacidad de formar biofilm: No formador (NB), Débil

formador (DB), Medio formador (MB) y Fuerte formador (FB). La clasificación se realizó siguiendo la metodología de Stepanović *et al.*, 2000, que utiliza la densidad óptica de corte (DO_{cut}) calculada como:

$$DO_{Cut} = DO_{neg} + 3 \times DE_{neg}$$

donde DO_{neg} es el promedio de los controles negativos y DE_{neg} su desviación estándar. Los rangos para cada categoría fueron:

- NB: Si la DO es menor o igual a la DO_{cut} ($DO \leq DO_{cut}$).
- DB: Si la DO es mayor a la DO_{cut} pero menor al valor de dos veces DO_{cut} ($DO_{cut} < DO \leq 2 \times DO_{cut}$).
- MB: Si la DO es mayor a dos veces la DO_{cut} pero menor al valor de cuatro veces DO_{cut} ($2 \times DO_{cut} < DO \leq 4 \times DO_{cut}$).
- FB: Si la DO es mayor a cuatro veces la DO_{cut} ($4 \times DO_c < DO$).

5.9 Evaluación de la relación entre los niveles de formación de *biofilm* de *Staphylococcus* spp. con la resistencia a antibióticos.

El análisis estadístico se realizó en RStudio (v. 2025.05.01 Build 513) con R (v. 4.4.1), utilizando los paquetes **tidyverse** (manipulación, transformación y visualización de datos), **stats** (funciones estadísticas), **vcd** (análisis de datos categóricos) y **readxl** (importación de archivos Excel).

Se calcularon promedios y se construyó una tabla de contingencia entre PR y PB para evaluar su distribución conjunta. La asociación entre variables se analizó inicialmente mediante la prueba de Chi-cuadrada; debido a que algunas celdas presentaron frecuencias menores a 5, se empleó la prueba exacta de Fisher, más adecuada en estos casos. Además, se calculó la correlación de Spearman para identificar relaciones crecientes o decrecientes.

Se generaron gráficos de barras agrupadas y proporcionales, boxplots y diagramas de dispersión para ilustrar la distribución de los datos y sus posibles tendencias.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Detección de formación de biofilm fenotípicamente – Agar CRA.

La capacidad de formación de biofilm de *Staphylococcus* spp. se evaluó mediante el análisis de las características coloniales, morfológicas y colorimétricas de las cepas cultivadas en medio CRA, obteniéndose seis categorías cromáticas distintas. A partir de estas clasificaciones, se establecieron tres grupos de formación de biofilm: fuerte, moderado y débil (Figura 4).

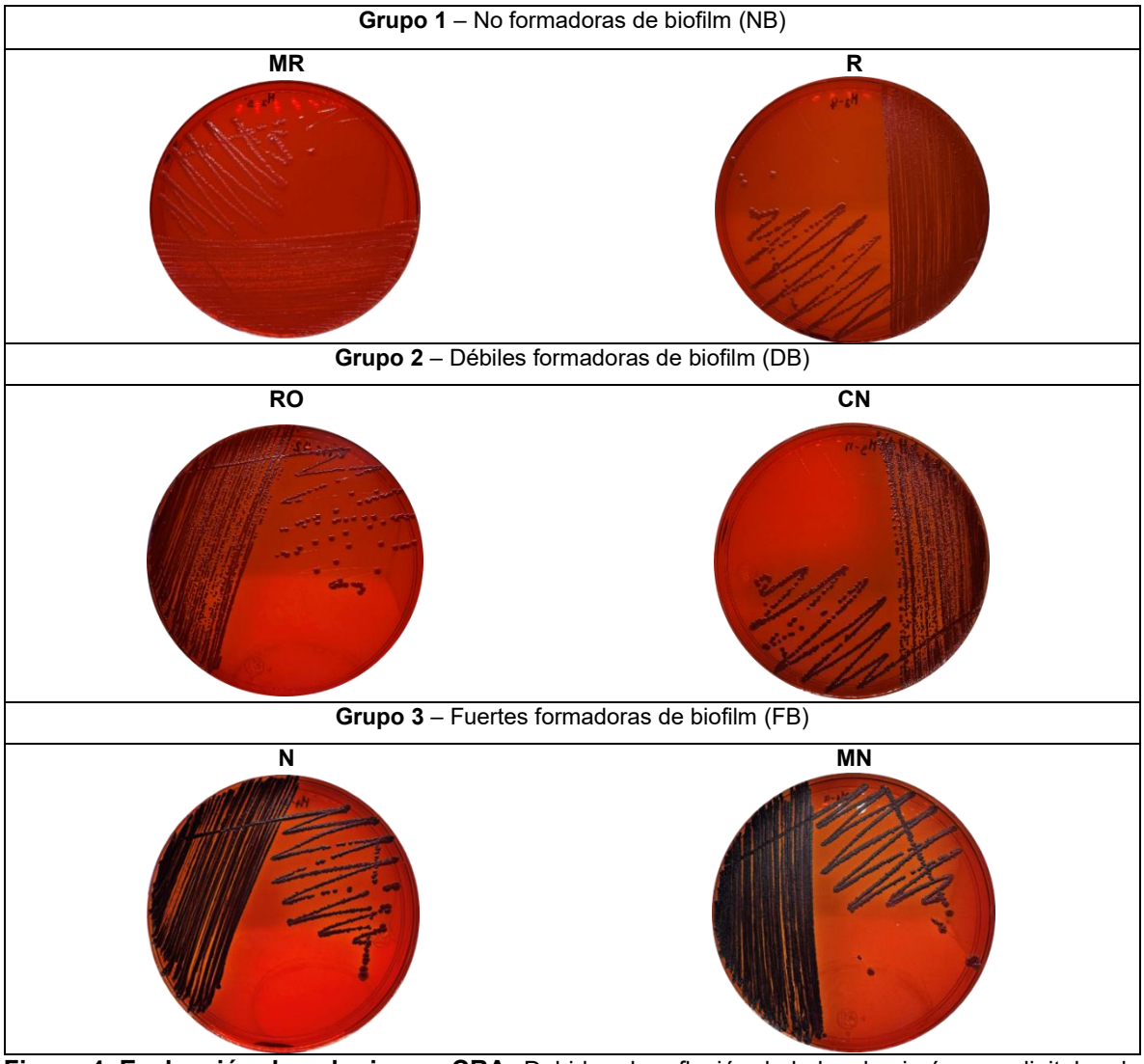


Figura 4. Evaluación de colonias en CRA. Debido a la reflexión de la luz, las imágenes digitales de las colonias no siempre corresponden perfectamente con la apariencia observada directamente a simple vista.

En el cuadro 2, se presentan los porcentajes de la capacidad de formación de biofilm en *S. aureus* por categoría colorimétrica clasificadas en grupos. Se observó que el 20.00% (3/15) de las cepas fueron fuertes formadoras de biofilm, el 40.00% (6/15) formadoras débiles, y el 40.00% restante (6/15) no formadoras de biofilm.

La escala colorimétrica utilizada en esta investigación ya había sido reportada previamente por Arciola *et al.* (2002), quienes evaluaron la capacidad fenotípica de formación de biofilm en 113 cepas de *S. epidermidis* (ECN) aisladas de infecciones asociadas a biomateriales, utilizando el medio CRA como método diagnóstico. La clasificación obtenida por estos autores fue la siguiente: Muy Negro (MN) – 35.39% (40/113), Negro (N) – 15.92% (18/113), Casi Negro (CN) – 6.13% (7/113), Rojo Oscuro (RO) – 19.46% (22/113), Rojo (R) – 14.15% (16/113) y Muy Rojo (MR) – 8.84% (10/113). Los aislamientos que mostraron una tinción parcial con el colorante Rojo Congo (CN) fueron considerados formadores débiles de biofilm. En general, el 57.52% (65/113) de las cepas analizadas resultaron formadoras de biofilm.

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de formación de biofilm de 28 aislamientos bacterianos obtenidos de leche mastítica bovina, compuestos por 15 cepas de *S. aureus* y 13 de ECN. Al aplicar la escala colorimétrica en medio CRA, los resultados para *S. aureus* fueron los siguientes: MN – 13.33% (2/15), N – 6.66% (1/15), CN – 6.66% (1/15), RO – 33.33% (5/15), R – 0.00% (0/15), MR – 40.00% (6/15), mientras que las cepas de ECN se clasificaron como: MN – 7.69% (1/13), N – 0.00% (0/13), CN – 0.00% (0/13), RO – 61.53% (8/13), R – 15.38% (2/13) y MR – 15.38% (2/13). En conjunto, el 64.28% (18/28) de los aislamientos fueron capaces de formar biofilm.

Cuadro 2. Capacidad de formación de biofilm *en S. aureus.*

Cepa	Escala colorimétrica en CRA	Tipo de formación de biofilm		
		Grupo 1 + (%)	Grupo 2 + (%)	Grupo 3 + (%)
M_2-f	MR	×		
M_2-b	MR	×		
M_2-v'	MR	×		
M_2-s'	MR	×		
M_3-g	MR	×		
M_3-q	MR	×		
M_4-b	N			×
M_4-a	RO		×	
M_4-L	RO		×	
M_4-u	RO		×	
M_4-g	MN			×
M_5-h	RO		×	
9785 #1	MN			×
MecA (+)	CN		×	
MecA (-)	RO		×	
Total: 15		6 (40.00%)	6 (40.00%)	3 (20.00%)

Escala colorimétrica adoptada para la evaluación de colonias en CRA: Escala de referencia (A); (Muy Rojo (MR); Rojo (R); Rojo Oscuro (RO); Casi Negro (CN); Negro (N); Muy Negro (MN); Apariencia de la colonia en la placa CRA (B), Grupo 1 – No formadores; Grupo 2 – Débiles formadores y Grupo 3 – Fuertes formadores.

En el cuadro 3, se presentan los porcentajes de la capacidad de formación de biofilm de ECN por categoría colorimétrica clasificadas por grupos. Se observó que el 61.53% (8/13) de las cepas fueron débiles formadoras de biofilm, el 30.76% (4/13) no formadoras, y el 7.71% (1/13) fuerte formadora de biofilm.

Al comparar con los resultados de Arciola *et al.* (2002), se observa un porcentaje ligeramente superior de cepas formadoras de biofilm en esta investigación. Esta diferencia podría atribuirse al origen distinto de los aislamientos, así como a la variabilidad en el número de cepas analizadas. Además, es posible que factores como la presión antimicrobiana, el ambiente hospitalario versus el entorno agropecuario y la genética de las cepas influyen en su capacidad para formar biofilm.

Asimismo, los hallazgos fueron comparados con los obtenidos por Oliveira *et al.* (2006), quienes evaluaron 32 cepas aisladas de vacas con mastitis subclínica en 12 granjas comerciales de la región de Ribatejo - Oeste, Portugal. En su estudio, el 37.5% (6/16) de las cepas de *S. aureus* y el 37.5% (6/16) de *S. epidermidis* fueron positivas a formación de biofilm mediante CRA. En contraste, en el presente estudio

el 60.0% (9/15) de las cepas de *S. aureus* y el 69.2% (9/13) de ECN resultaron positivas a la prueba, lo cual representa un incremento considerable.

Cuadro 3. Capacidad de formación de biofilm en ECN.

Cepas	Escala colorimétrica en CRA	Tipo de formación de biofilm		
		Grupo 1 + (%)	Grupo 2 + (%)	Grupo 3 + (%)
M_3-m	RO		×	
M_3-n	RO		×	
M_4-j	MR	×		
M_4-v	R	×		
M_4-p	RO		×	
M_4-k	MR	×		
M_5-a	RO		×	
M_5-e	R	×		
MC #2	RO		×	
MC #3	RO		×	
MC #4	RO		×	
0919 #1	RO		×	
0321 #1	MN			×
Total: 13		4 (30.76%)	8 (61.53%)	1 (7.71%)

Escala colorimétrica adoptada para la evaluación de colonias en CRA: Escala de referencia (A); (Muy Rojo (MR); Rojo (R); Rojo Oscuro (RO); Casi Negro (CN); Negro (N); Muy Negro (MN); Apariencia de la colonia en la placa CRA (B), Grupo 1 – No formadores; Grupo 2 – Débiles formadores y Grupo 3 – Fuertes formadores.

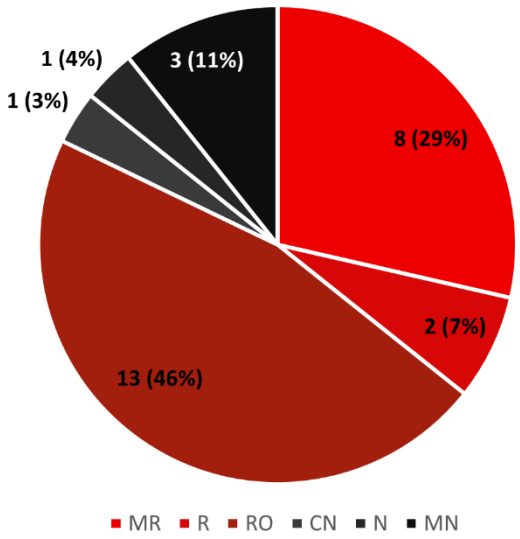


Figura 5. Capacidad de formación de biofilm en *Staphylococcus* spp. por CRA.

En la figura 5, se muestran las categorías colorimétricas, junto con la cantidad de cepas de *S. aureus* y ECN clasificadas en cada grupo. Se observó que el 46.00 % (13/28) de las cepas se clasificaron como RO (débiles formadores), el 29.00 %

(8/28) como MR (no formadores), el 11.00 % (3/28) como MN (fuertes formadores), el 7.00 % (2/28) como R (no formadoras) y finalmente el 3.00 % (1/28) y 4.00 % (1/28) como C y N (fuertes formadores), respectivamente.

Aunque los porcentajes obtenidos son más elevados que los reportados por Oliveira *et al.* (2006), esta diferencia podría deberse a causas multifactoriales, tales como el origen geográfico de los aislamientos, las condiciones de manejo y sanidad de los hatos lecheros, las prácticas de ordeño, el tamaño de la muestra, e incluso la diversidad genética entre cepas. Adicionalmente, la formación de biofilm puede estar influida por condiciones específicas del entorno, como la presencia de superficies inertes (equipos de ordeño, tuberías, etc.) y residuos de antibióticos en la glándula mamaria, lo cual podría favorecer la persistencia y adaptación de bacterias formadoras de biofilm.

Cuantificación de la formación de biofilm.

El análisis de la formación de biofilm mediante la técnica de microtitulación con cristal violeta arrojó resultados mixtos, ya que la mayoría de las cepas de *S. aureus* y ECN mostraron capacidad para formar biofilm (Figura 6).

Entre los 28 aislados de *Staphylococcus* spp., analizados en el presente estudio, se observaron variaciones en la capacidad de formación de biofilm. En términos generales, el 75.00% (21/28) contaron con la capacidad de formar biofilm, el 25.00% (7/28) se clasificó como NB, el 60.71% (17/28) como DB, el 10.71% (3/28) como MB y el 3.57% (1/28) como FB.

Al diferenciar las cepas por especie, se encontró que el 26.66% (4/15) de las cepas de *S. aureus* fueron NB, el 53.33% (8/15) DB, el 13.33% (2/15) MB y el 6.66 % (1/15) FB. En contraste, las cepas de ECN presentaron la siguiente distribución: 23.07% (3/13) NB, 69.23% (9/13) DB y 7.69% (1/13) MB.

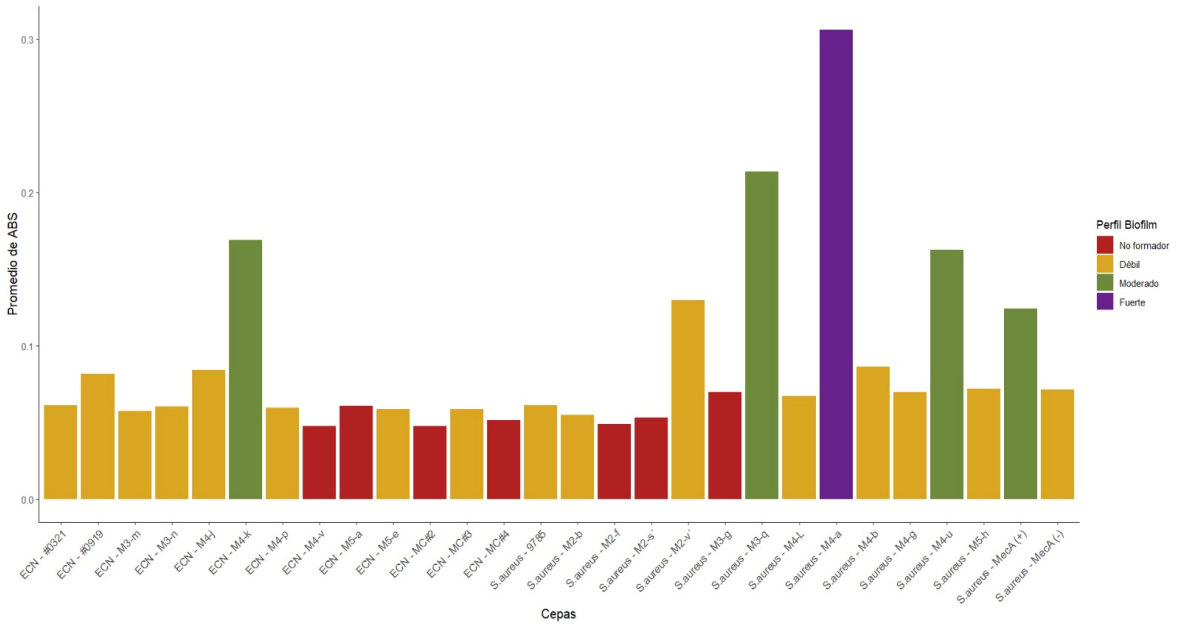


Figura 6. Nivel de formación de biofilm en cepas de *S. aureus* y ECN.

En este estudio se evidenció la capacidad de *S. aureus* para formar biofilm, ya que el 73.33% (11/15) de las cepas evaluadas presentaron esta característica, aunque en distintos niveles de intensidad, como se muestra en el cuadro 4.

Los resultados son similares a los reportados por Moreno *et al.* (2025), quienes clasificaron 155 cepas de *S. aureus* de la siguiente manera: 1.93 % (3/155) NB, 25.16 % (39/155) MB, 55.32 % (78/155) DB y 21.93 % (34/155) FB.

Estudios internacionales han documentado frecuencias más elevadas de formación de biofilm en cepas de *S. aureus*, con rangos entre el 90.00 % y el 99.00 % (Avila-Novoa *et al.*, 2018; Piechota *et al.*, 2018; Eidaroos *et al.*, 2025), este resultado contrasta con los obtenidos en el presente estudio. Esta diferencia posiblemente obedezca a las condiciones de aislamiento, a factores de estrés ambiental, a la diversidad genética entre cepas o a sus respectivos perfiles de resistencia antimicrobiana.

Cuadro 4. Cuantificación de formación de biofilm en *S. aureus*.

Cepas	Nivel de formación de biofilm			
	NB	DB	MB	FB
M_2-f	×			
M_2-b		×		
M_2-v´		×		
M_2-s´	×			
M_3-g	×			
M_3-q			×	
M_4-b		×		
M_4-a				×
M_4-L		×		
M_4-u			×	
M_4-g		×		
M_5-h		×		
9785#1		×		
MecA(+)		×		
MecA(-)	×			
Total: 15	4 (26.66%)	8 (53.33%)	2 (13.33%)	1 (6.66%)

Cuantificación de formación de biofilm*:* Niveles de formación; No Formador de Biofilm (NB); Débil Formador de Biofilm (DB); Medio Formador de Biofilm (MB); Fuerte Formador de Biofilm (FB).

De igual manera, este estudio evidenció la capacidad de los ECN para formar biofilm, ya que el 76.92% (10/13) de las cepas analizadas presentaron esta característica, aunque en diferentes niveles de intensidad, como se detalla en el cuadro 5.

En cuanto a las cepas de ECN Moreno *et al.* (2025), reportaron un 5.55 % (2/36) NB, 22.22 % (8/36) DB, 30.55 % (11/36) MB y 41.66 % (15/36) FB. Sin embargo, se observa una diferencia notable: las cepas de ECN analizadas en el presente estudio no mostraron capacidad para formar FB, lo cual puede adjudicarse a diversos factores, la variabilidad genética de las cepas y al estrés al que fueron sometidas.

Los hallazgos en el presente estudio revelaron que el 75.00% (21/28) de los aislamientos de *Staphylococcus* spp, presentaron capacidad de formar biofilm, lo cual es consistente con reportes previos (ECN – 65.90% y *S. aureus* – 100%) (Francisco *et al.*, 2021; Eidaroos *et al.*, 2025), Sin embargo, se han detectado niveles notablemente altos (54.8%) de *S. aureus* clasificados como NB en hatos lecheros brasileños en la investigación realizada por Lee *et al.* (2014). Esta inconsistencia en la capacidad de formación de biofilm entre los aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina remarca la posible cronicidad de las infecciones inducidas por este patógeno. No obstante, aún es necesario profundizar en la

investigación de factores como el estrés ambiental, la diversidad de cepas y la ubicación geográfica, los cuales podrían influir en la expresión génica relacionada con la formación de biofilm.

Cuadro 5. Cuantificación de formación de biofilm en ECN.

Cepas	Nivel de formación de biofilm			
	NB	DB	MB	FB
M_3-m		×		
M_3-n		×		
M_4-j		×		
M_4-v		×		
M_4-p		×		
M_4-k			×	
M_5-a	×			
M_5-e		×		
MC#2	×			
MC#3		×		
MC#4	×			
0919#1		×		
0321#1		×		
Total: 13	3 (23.07%)	9 (69.23%)	1 (7.70%)	0 (0.00%)

Cuantificación de formación de biofilm*:* Niveles de formación; No Formador de Biofilm (NB); Débil Formador de Biofilm (DB); Medio Formador de Biofilm (MB); Fuerte Formador de Biofilm (FB).

Cuadro 6. Perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de *S. aureus*.

Cepas aisladas	**AM**	**CFX**	**CPF**	**CLM**	**E**	**PE**	**TE**	**CF**	**DC**	**GE**	**STX**	**VA**	**R%**	**S%**
M_2-f	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	8.33	91.66
M_2-b	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	58.33	41.66
M_2-v´	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	8.33	91.66
M_2-s´	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	36.36	63.63
M_3-g	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	25.0	75.0
M_3-q	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	8.33	91.66
M_4-b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	100
M_4-a	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	25.0	75.0
M_4-L	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	66.7	33.3
M_4-u	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	33.33	66.66
M_4-g	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	83.33	16.66
M_5-h	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	8.33	91.66
9785#1	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	8.33	91.66
MecA(+)	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	58.33	41.66
MecA(-)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	16.66	83.33
Total%	60.00	53.33	6.66	26.66	26.66	46.66	13.33	53.33	26.66	0.00	20.00	20.00		

AM: Ampicilina, CFX: Cefotaxima, CPF: Ciprofloxacino, CLM: Clindamicina, E: Eritromicina, PE: Penicilina, TE: Tetraciclina, CF: Cefalotina, DC: Dicloxacilina, GE: Gentamicina, STX: Sulfametoxazol/trimetoprim VA: Vancomicina. R: Resistente y S: Sensible. Las etiquetas de identificación de las cepas fueron designadas por el orden de aislamiento con literales (M_2 – Muestreo 2, M_3 – Muestreo 3, M_4 – Muestreo 4 y M_5 – Muestreo 5). Los fenotipos (R y S) fueron determinados en base a los criterios establecidos por el CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024), ID: Investigación Diagnóstica (ID, 2020). EUCAST: European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2025).

Al analizar los perfiles de resistencia, se observó un 60.00% de resistencia a ampicilina, seguido de un 53.33% a cefotaxima y cefalotina, y un 46.66% a penicilina. Estos altos porcentajes indican que las cepas de *S. aureus* analizadas

han desarrollado resistencia a antibióticos pertenecientes a la familia de los β-lactámicos, incluyendo penicilinas y cefalosporinas de primera y tercera generación. Asimismo, se evidenció la presencia de una cepa con resistencia al 83.33% de los antibióticos evaluados (10/12), incluyendo ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, tetraciclina, cefalotina, sulfametoxazol/trimetoprim y vancomicina. Esta cepa mostró resistencia a múltiples familias de antimicrobianos: β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas de primera y tercera generación), fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, tetraciclinas y glicopéptidos, clasificándola como una bacteria multirresistente (MDR; por sus siglas en inglés).

En México, diversos estudios han reportado niveles del 100% de resistencia bacteriana a penicilina, amoxicilina y dicloxacilina (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008; León-Galván *et al.*, 2015), lo cual coincide parcialmente con lo observado en este estudio. Asimismo, se ha evidenciado un aumento significativo en la resistencia a la cefalotina: en 2008, el 30% de las cepas de *S. aureus* presentaban resistencia (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008), mientras en el presente trabajo se registró un 53.33%.

Cuadro 7. Perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de ECN.

Cepas aisladas	AM	CFX	CPF	CLM	E	PE	TE	CF	DC	GE	STX	VA	R%	S%
M_3-m	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	16.66	83.33
M_3-n	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	25.00	75.00
M_4-j	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	50.00	50.00
M_4-v	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.00	100
M_4-p	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	33.33	66.66
M_4-k	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	66.66	33.33
M_5-a	R	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	41.66	58.33
M_5-e	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	16.66	83.33
MC#2	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	33.33	66.66
MC#3	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	33.33	66.66
MC#4	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	16.66	83.33
0919#1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	100
0321#1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	8.33	91.66
Total%	69.23	38.43	7.69	23.07	38.46	30.76	38.46	38.46	30.76	0.00	0.00	0.00		

AM: Ampicilina, CFX: Cefotaxima, CPF: Ciprofloxacino, CLM: Clindamicina, E: Eritromicina, PE: Penicilina, TE: Tetraciclina, CF: Cefalotina, DC: Dicloxacilina, GE: Gentamicina, STX: Sulfametoxazol/trimetoprim VA: Vancomicina. R: Resistente y S: Sensible. Las etiquetas de identificación de las cepas fueron designadas por el orden de aislamiento con literales (M_2 – Muestreo 2, M_3 – Muestreo 3, M_4 – Muestreo 4, M_5 – Muestreo 5 y MC – Mastitis Clínica). Los fenotipos (R y S) fueron determinados en base a los criterios establecidos por el CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024), ID: Investigación Diagnóstica (ID, 2020). EUCAST: European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2025).

En el análisis de los ECN, se observó una resistencia del 69.23% a ampicilina, seguida de un 38.43% a cefotaxima, eritromicina, tetraciclina y cefalotina, así como un 30.76% a penicilina y dicloxacilina. Estos porcentajes reflejan resistencia a

antibióticos pertenecientes a diversas familias, como los β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas de primera y tercera generación), macrólidos y tetraciclinas. Además, se evidenció la presencia de una cepa con resistencia al 66.66% de los antibióticos evaluados (8/12), incluyendo ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacino, eritromicina, penicilina, tetraciclina, cefalotina y dicloxacilina. Esta cepa presentó resistencia a múltiples familias de antimicrobianos: β-lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas, clasificándola como MDR.

Es importante mencionar un estudio realizado por Moreno *et al.* (2025), en el que se evaluaron 191 aislados de *Staphylococcus* spp., en mastitis clínica y subclínica bovina, de 35 granjas diferentes. De estos, 36 pertenecían a ECN. *S. borealis* mostró resistencia a penicilina en un 61.53% (8/13), a eritromicina en un 15.38% (2/13) y a clindamicina en un 7.69% (1/13). Por su parte, *S. chromogenes* presentó resistencia a penicilina en un 41.66% (5/12) y a eritromicina en un 8.33% (1/12). En el caso de *S. haemolyticus*, el 80.00% (4/5) de las cepas fueron resistentes a penicilina. De las tres cepas evaluadas de *S. saprophyticus*, una fue resistente a penicilina, mientras que las otras dos presentaron resistencia a clindamicina y eritromicina, respectivamente.

Estos resultados coinciden con lo reportado en el presente estudio, evidenciando una elevada resistencia de los ECN y *S. aureus* a los antibióticos β-lactámicos, junto con una tendencia creciente hacia la resistencia a otros grupos, como los macrólidos y las lincosamidas. Esta situación sugiere la presencia de MDR clasificación aplicable debido a la presencia de ciertas cepas con resistencia, al menos, a un antibiótico perteneciente a tres familias distintas en pruebas *in vitro* (Elshobary *et al.,* 2025). El aumento observado en la resistencia podría estar asociado a una exposición prolongada a antibióticos, especialmente β-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas de primera y tercera generación), comúnmente utilizados tanto en el tratamiento de la mastitis como en programas preventivos durante la lactancia o el periodo de secado. Por otro lado, la resistencia desarrollada frente a macrólidos y lincosamidas posiblemente derive de sus mecanismos de acción similares, dado a

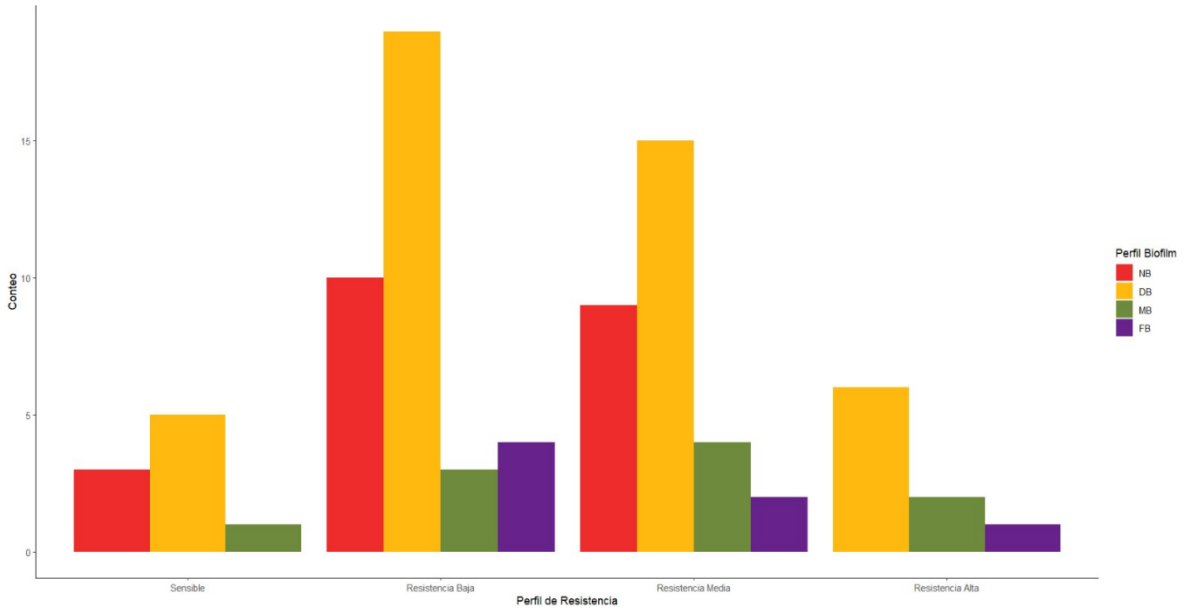
su similitud en la inhibición de la síntesis proteica bacteriana mediante su unión a la subunidad 50S del ribosoma (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Debido a los altos niveles de resistencia a antibióticos presentes en *Staphylococcus* spp., es de vital importancia evaluar los factores y características de virulencia presentes en estos patógenos, con el objetivo de diseñar estrategias de control eficaces (Fidelis *et al*., 2024).

Estimación de la relación entre los niveles de formación de biofilm de *Staphylococcus* spp. con la resistencia a antibióticos.

Para establecer una posible relación entre la resistencia antimicrobiana y la formación de biofilm en las 28 cepas aisladas de mastitis bovina, se empleó la siguiente estrategia: primero, se evaluaron los resultados de formación de biofilm en contraste con el nivel de resistencia antimicrobiana de cada cepa (Figura 7). La correlación estimada con la prueba de *Spearman* entre el grado de resistencia y la formación de biofilm fue débil y no significativa ($P \geq 0.05$) (Figura 8).

Figura 7. Distribución de la formación de biofilm con relación a la resistencia antibiótica.



Los resultados sugieren que no hay asociación estadísticamente significativa entre PR (Perfil de resistencia) y FDB (Formación de Biofilm). Lo cual sugiere a la formación de biofilm como independiente de la resistencia antibiótica. Estos resultaron contrastan con lo reportado por Eidaroos *et al.* (2025), donde aislaron 40

cepas de *S. aureus* a partir de muestras de leche de bovinos sanos y con mastitis clínica, provenientes de granjas privadas en la gobernación de Damietta, Egipto. En la cual observaron una fuerte correlación positiva entre la formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana. La prueba exacta de Fisher reveló una asociación significativa entre la formación fuerte de biofilm y la resistencia a penicilina, cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, eritromicina y clindamicina ($P \leq 0.05$). Así mismo todos los aislados FB 100% (26/26) fueron resistentes a ceftriaxona y ceftazidima, y también presentaron altos niveles de resistencia a penicilina, clindamicina y cefoxitina 96.15% (25/26). Asimismo, un alto porcentaje mostró resistencia a eritromicina 88.46% (23/26), seguido por ampicilina-sulbactam 73.07% (19/26).

Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente estudio, donde las cepas con FB representaron únicamente el 6.66% (1/15) de los aislados de *S. aureus*, y esta cepa mostró resistencia únicamente a penicilina, ampicilina y eritromicina. El grupo más predominante fue el de DB, con un 53.33% (8/15), caracterizado por una alta resistencia a cefotaxima y cefalotina 62.50% (5/8), seguido por resistencia a ampicilina, clindamicina y penicilina 50.00% (4/8). El grupo con MB representó el 13.33% (2/15), con resistencia del 100% (2/2) a ampicilina, y del 50.00% (1/2) a cefotaxima, cefalotina y penicilina.

Además, en la investigación realizada por Francisco *et al.* (2021), se estudió una colección de 44 cepas pertenecientes al grupo de ECN, aisladas de 22 granjas diferentes ubicadas en las principales zonas productoras de leche del sureste de Brasil. Estas cepas fueron obtenidas de bovinos con mastitis subclínica. La mayoría de las cepas analizadas 65.90% (29/44) presentaron capacidad para formar biofilm, aunque en distintos niveles: (29.54%) (13/44) fueron clasificadas como FB, 15.90% (7/44) como MB, 20.45% (9/44) como DB y 34.09% (14/44) como NB. En cuanto a la resistencia antimicrobiana, la mayoría fue resistente a penicilina 54.54 (24/44), seguida de ampicilina 52.27% (23/44). Además, el 13.6% (6/44) de los aislados fueron clasificados como MDR, al presentar resistencia al menos a tres clases de antibióticos.

En el presente estudio, predominaron las DB 69.23% (9/13), las cuales mostraron una alta resistencia a ampicilina 55.55% (5/9), seguida de cefotaxima y cefalotina 44.44% (4/9), y penicilina 33.33% (3/9). Las NB representaron el 23.07% (3/13) y presentaron una resistencia del 100% (3/3) a ampicilina, seguida de un 66.66% (2/3) a clindamicina, eritromicina, tetraciclina y dicloxacilina. Finalmente, la MB correspondió al 7.69% (1/13) y presentó resistencia del 100% (1/1) a ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacino, eritromicina, penicilina, tetraciclina, cefalotina y dicloxacilina, posicionándose como la bacteria con el perfil de mayor resistencia antimicrobiana 66.66% (8/12), lo que confirma la presencia de cepas MDR en este estudio.

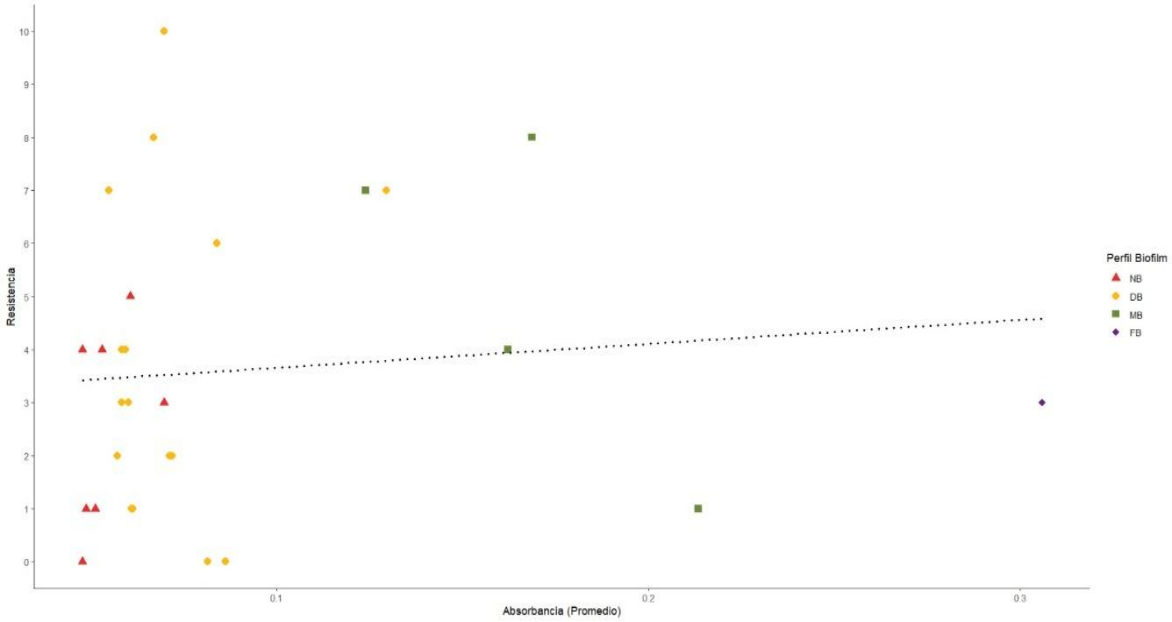


Figura 8. Relación entre el grado de resistencia y la formación de biofilm de los aislados de *Staphylococcus* spp.

La correlación estimada mediante la prueba de Spearman entre el grado de formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana en el presente estudio fue negativa y no significativa ($P \geq 0.05$) (Figura 8). Este hallazgo coincide con lo reportado por Fidelis *et al.* (2024), quienes evaluaron 111 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de bovinos con mastitis clínica y subclínica en 24 unidades de producción lechera de la Universidad de São Paulo, Brasil, sin encontrar diferencias significativas en la susceptibilidad antimicrobiana entre los aislamientos formadores y no formadores de biofilm. De manera similar, Francisco *et al.* (2021) evaluaron la

relación entre la formación de biofilm y la resistencia a antibióticos en ECN, sin encontrar una correlación significativa entre el fenotipo de formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana. Estos resultados sugieren que podrían estar involucrados otros factores en la formación de biofilm por *S. aureus* y ECN.

La ausencia de asociación entre la formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana podría deberse a la falta de condiciones ambientales específicas (como el estrés bacteriano) durante las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Asimismo, se ha propuesto que la exposición a antimicrobianos durante la evaluación de la formación de biofilm podría favorecer o incrementar dicha capacidad.

VII. CONCLUSIÓN.

El presente estudio demuestra que *S. aureus* (73.33%) y los ECN (76.92%) tienen la capacidad de formar biofilm en diferentes niveles. La mayoría de las cepas analizadas presentaron RAM, observándose diferentes perfiles de resistencia frente a antibióticos comúnmente utilizados, como β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas de primera y tercera generación), macrólidos y tetraciclinas. En particular, se identificó una cepa MDR en cada grupo bacteriano. La cepa MDR de *S. aureus* mostró resistencia al 83.33 % de los antibióticos evaluados, mientras que la cepa MDR de ECN fue resistente al 66.66 % de los antimicrobianos probados. Esta elevada multirresistencia evidencia el potencial riesgo terapéutico que representan estas cepas. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre PR y la FDB, lo que sugiere que esta capacidad podría ser independiente de la resistencia a los antibióticos e influenciable por diferentes factores de virulencia de la bacteria. Estos hallazgos refuerzan la preocupación de que los tratamientos actualmente utilizados podrían no ser suficientes para erradicar cepas con capacidad de formar biofilm, lo que implicaría no solo una menor eficacia en el control de infecciones intramamarias en animales de producción, sino también un riesgo adicional al favorecer la selección de microorganismos aún más resistentes. Si bien el biofilm desempeña un papel importante en el desarrollo de infecciones intramamarias, se requieren nuevos estudios y debe incentivarse la búsqueda de terapias alternativas capaces de interrumpir o erradicar su formación.

VIII. PERSPECTIVAS.

- **Implementación de protocolos de higiene que prevengan formación de biofilm:** Diseñar y validar procedimientos de limpieza y desinfección específicos para superficies donde *el* biofilm pueda formarse (máquinas de ordeño, líneas de leche, manos del personal).
- **Desarrollo de estrategias anti-biofilm:** Evaluar compuestos naturales, proteínas, bacteriófagos, enzimas dispersantes, nanopartículas u otros agentes con actividad anti-biofilm para prevenir o tratar infecciones intramamarias.
- **Estudios *in vivo* sobre biofilm en mastitis bovina:** Aunque la formación de biofilm se ha demostrado *in vitro*, aún se requiere entender cómo se comporta *in vivo*, dentro de la glándula mamaria, considerando factores como inmunidad del hospedero, estrés ambiental y microbiota.

IX. LITERATURA CITADA.

Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., y Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Veterinary Research, 12(1). https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3

Abril, A. G., Villa, T. G., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., y Carrera, M. (2020). *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. En Toxins (Vol. 12, Número 9). https://doi.org/10.3390/toxins12090537

Acosta, M, A., Mira Hernández, J., y Posada Arias, S. (2017). Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas. https://web.archive.org/web/20180411111618id_/http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/jals/article/viewFile/1461/1306

Andrews, A H; Williams, B. M. (2004). Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle - Second edition. En Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle. https://www.agropustaka.id/wp-content/uploads/2020/04/agropustaka.id_buku_Bovine-Medicine-Diseases-and-Husbandry-of-Cattle.pdf

Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Baldassarri, L., y Montanaro, L. (2005). Prevalence of cna, fnbA and fnbB adhesin genes among Staphylococcus aureus isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS Microbiology Letters, 246(1). https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.035

Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., y Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. Biomaterials, 23(21). https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00171-0

Artursson, K., Söderlund, R., Liu, L., Monecke, S.,y Schelin, J. (2016). Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. Veterinary Microbiology, 193. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.012

Ashraf, S., Cheng, J., y Zhao, X. (2017). Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. Scientific Reports, 7. https://doi.org/10.1038/srep40608

Atulya, M., Jesil Mathew, A., Venkata Rao, J., y Mallikarjuna Rao, C. (2014). Influence of milk components in establishing biofilm mediated bacterial mastitis infections in cattle: A fractional factorial approach. Research in Veterinary Science, 96(1). https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.001

Avila-Novoa, M. G., Iñíguez-Moreno, M., Solís-Velázquez, O. A., González-Gómez, J. P., Guerrero-Medina, P. J., y Gutiérrez-Lomelí, M. (2018). Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Contact Surfaces in the Dairy Industry of Jalisco, Mexico. Journal of Food Quality, 2018. https://doi.org/10.1155/2018/1746139

Bannoehr, J., Ben Zakour, N. L., Waller, A. S., Guardabassi, L., Thoday, K. L., Van Den Broek, A. H. M., y Fitzgerald, J. R. (2007). Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: Insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. Journal of Bacteriology, 189(23). https://doi.org/10.1128/JB.01150-07

Becker, K., Skov, R. L., y Eiff, C. Von. (2015). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci. En Manual of Clinical Microbiology. https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch21

Bedolla, C., y Ponce De León, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera - Economic causalties inflicted by the bovine mastitis in the milk industry). Redvet, 9(4). https://www.redalyc.org/pdf/636/63611952010.pdf

Bjerketorp, J., Jacobsson, K., y Frykberg, L. (2004). The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. FEMS Microbiology Letters, 234(2). https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.040

Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., Larriestra, A., Reinoso, E., Lasagno, M., Ferrari, M., Ducrós, E., Frigerio, C., Bettera, S., Pellegrino, M., Frola, I., Dieser, S., y Vissio, C. (2011). War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. En Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.https://www.researchgate.net/publication/266012729_War_against_mastitis_Current_concepts_on_controlling_bovine_mastitis_pathogens

Bose, S., Khodke, M., Basak, S., y Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilm producing *Staphylococci*: Need of the hour. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 3(6). https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1ytype=pdfydoi=8f9c5569fd5ff9282a2a4725c2f78ebeb1d18a57

Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., y Haesebrouck, F. (2009). Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. En Veterinary Microbiology (Vol. 135, Números 3–4). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.025

Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., y Kolter, R. (2005). Biofilm: The matrix revisited. In Trends in Microbiology (Vol. 13, Issue 1). https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006

Branda, S. S., Vik, Å., y Friedman, L. (2005). ScienceDirect.com - Trends in Microbiology - Biofilm: the matrix revisited. En Trends Microbiol.

Brisuela Raygosa, J., Palacios Torres, J., López Valencia, G., Hori-Oshima, S., Herrera Ramírez, J. C., Pujol Manríquez, L. C., Angulo Valadez, C. E., Rentería Evangelista, T. B., y Medina Basulto, G. E. (2018). Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de mastitis bovina en establos de la Península

de Baja California, México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 9(4). https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4365

Brouillette, E., Talbot, B. G., y Malouin, F. (2003). The fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. Infection and Immunity, 71(4). https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2292-2295.2003

Caffarena, R. D., Meireles, M. V., Carrasco-Letelier, L., Picasso-Risso, C., Santana, B. N., Riet-Correa, F., & Giannitti, F. (2020). Dairy Calves in Uruguay Are Reservoirs of Zoonotic Subtypes of Cryptosporidium parvum and Pose a Potential Risk of Surface Water Contamination. Frontiers in Veterinary Science, 7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00562

Calvo J y Martínez-Martínez L. [Antimicrobial mechanisms of action]. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. 2009 Jan;27(1):44-52. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001 PMID: 19218003.

Cappitelli, F., Polo, A., y Villa, F. (2014). Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. En Food Engineering Reviews (Vol. 6, Números 1–2). https://doi.org/10.1007/s12393-014-9077-8

Castilho, I. G., Dantas, S. T. A., Langoni, H., Araújo, J. P., Fernandes, A., Alvarenga, F. C. L., Maia, L., Cagnini, D. Q., y Rall, V. L. M. (2017). Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. Journal of Dairy Science, 100(8). https://doi.org/10.3168/jds.2017-12700

Cheng, W. N., y Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. En Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (Vol. 33, Número 11). https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156

Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus.* En Virulence (Vol. 12, Número 1). https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688

CLSI. Perfomance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024. Disponible en: https://es.scribd.com/document/758856268/Clsi-m100-Ed34-2024-Pantalla-1

Cole, K., Foster, D., Russell, J. E., Golubchik, T., Llewelyn, M., Wilson, D. J., Crook, D., y Paul, J. (2019). Draft Genome Sequences of 64 Type Strains of 50 Species and 25 Subspecies of the Genus Staphylococcus Rosenbach 1884. Microbiology Resource Announcements, 8(17). https://doi.org/10.1128/mra.00062-19

Costa, J. C. M., Espeschit, I. de F., Pieri, F. A., Benjamin, L. A., y Moreira, M. A. S. (2014). Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. Ciência Rural, 44(4). https://doi.org/10.1590/s0103-84782014000400015

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., y James, G. (1994). Biofilm, the customized microniche. En Journal of Bacteriology (Vol. 176, Número 8). https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994

Cucarella, C., Tormo, M. Á., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, Í., y Penadés, J. R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine Staphylococcus aureus. Infection and Immunity, 72(4). https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004

Darwish, S. F., y Asfour, H. A. E. (2013). Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. The Scientific World Journal, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/378492

De Buck, J., Ha, V., Naushad, S., Nobrega, D. B., Luby, C., Middleton, J. R., De Vliegher, S., y Barkema, H. W. (2021). Non-aureus *Staphylococci* and Bovine Udder Health: Current Understanding and Knowledge Gaps. En Frontiers in Veterinary Science (Vol. 8). https://doi.org/10.3389/fvets.2021.658031

Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., y

Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(4). https://doi.org/10.1099/ijs.0.63413-0

Donlan, R. M. (2002). Biofilm: Microbial life on surfaces. En Emerging Infectious Diseases (Vol. 8, Número 9). https://doi.org/10.3201/eid0809.020063

Dorneles, E. M. S., Fonseca, M. D. A. M., Abreu, J. A. P., Lage, A. P., Brito, M. A. V. P., Pereira, C. R., Brandão, H. M., Guimarães, A. S., y Heinemann, M. B. (2019). Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. MicrobiologyOpen, 8(5). https://doi.org/10.1002/mbo3.736

Dramsi, S., Y Bierne, H. (2017). Spatial organization of cell wall-anchored proteins at the surface of gram-positive bacteria. En Current Topics in Microbiology and Immunology (Vol. 404). https://doi.org/10.1007/82_2016_4

Duarte, C. M., Freitas, P. P., y Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. En Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (Vol. 27, Número 6). https://doi.org/10.1177/1040638715603087

Eidaroos, N. H., Algammal, A. M., Mohamaden, W. I., Alenzi, A. M., Alghamdi, S., Kabrah, A., ... y El-Tarabili, R. M. (2025). Virulence traits, agr typing, multidrug resistance patterns, and biofilm ability of MDR *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical mastitis in dairy cows. *BMC microbiology*, *25*(1), 155. https://doi.org/10.1186/s12866-025-03870-3

Elhadidy, M., y Elsayyad, A. (2013). Uncommitted role of *enterococcal* surface protein, Esp, and origin of isolates on biofilm production by *Enterococcus faecalis* isolated from bovine mastitis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 46(2). https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.02.002

Elhadidy, M., y Zahran, E. (2014). Biofilm mediates *Enterococcus faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells. Letters in Applied Microbiology, 58(3). https://doi.org/10.1111/lam.12184

Elshobary, M. E., Badawy, N. K., Ashraf, Y., Zatioun, A. A., Masriya, H. H., Ammar, M. M., Mohamed, N. A., Mourad, S., & Assy, A. M. (2025). Combating Antibiotic Resistance: Mechanisms, Multidrug-Resistant Pathogens, and Novel Therapeutic Approaches: An Updated Review. *Pharmaceuticals*, *18*(3), 402. https://doi.org/10.3390/ph18030402

EUCAST. 2025 Clinical Breakpoints Table v. 15.0. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.xlsx

Fabres-Klein, M. H., Caizer Santos, M. J., Contelli Klein, R., Nunes de Souza, G., y de Oliveira Barros Ribon, A. (2015). An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. BMC Veterinary Research, 11(1). https://doi.org/10.1186/s12917-015-0319-7

Fernández Bolaños, O. F., Trujillo Graffe, J. E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., & Granja Salcedo, Y. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Revista electrónica de Veterinaria, 13(11), 1-20. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

Fidelis, C. E., Orsi, A. M., Freu, G., Gonçalves, J. L., y Santos, M. V. D. (2024). Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Isolates from Bovine Mastitis. Veterinary sciences, 11(4), 170. https://doi.org/10.3390/vetsci11040170

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., y Kjelleberg, S. (2016). Biofilm: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology, 14(9), 563-575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., y Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. En Nature Reviews Microbiology (Vol. 12, Número 1). https://doi.org/10.1038/nrmicro3161

Fox, L. K., y Hancock, D. D. (1989). Effect of Segregation on Prevention of Intramammary Infections by *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Science, 72(2). https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79138-4

Francisco, M. S., Rossi, C. C., Brito, M. A. V. P., Laport, M. S., Barros, E. M., y Giambiagi-Demarval, M. (2021). Characterization of biofilms and antimicrobial resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* species involved with subclinical mastitis. Journal of Dairy Research, 88(2). https://doi.org/10.1017/S0022029921000285

Freeman, D. J., Falkiner, F. R., y Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. Journal of Clinical Pathology, 42(8). https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872

García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. del R., y Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa en México. Biomédica, 39(3). https://doi.org/10.7705/biomedica.4131

Garrity, G. M. Bell, J. A. y Lilburn, T. G. (2003). Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. https://www.researchgate.net/publication/233815284_Taxonomic_Outline_of_the_Prokaryotic_Genera_Bergey's_Manual_of_Systematic_Bacteriology

Guzmán-Rodríguez, J. J., Salinas-Pérez, E., León-Galván, F., Barboza-Corona, J. E., Valencia-Posadas, M., Ávila-Ramos, F., Hernández-Marín, J. A., Ramírez-Sáenz, D., y Gutiérrez-Chávez, A. J. (2022). Relación entre la resistencia a antibióticos y la producción de biofilm de aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de mastitis bovina. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 12(4). https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5645

Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E. J., Mah, T. F., Griffith, M., y Alarcon, E. I. (2021). Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm

models. En iScience (Vol. 24, Número 5). https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443

Haesler, E., Swanson, T., Ousey, K., y Carville, K. (2019). Clinical indicators of wound infection and biofilm: Reaching international consensus. Journal of Wound Care, 28(Sup3b). https://doi.org/10.12968/jowc.2019.28.sup3b.s4

Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., y Pyörälä, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. Journal of Applied Microbiology, 103(4). https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x

Heilmann, C. (2011). Adhesion mechanisms of *Staphylococci*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 715. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_7

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., y Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents, 35(4), 322–332. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.12.011

Hordofa, D. L. (2022). Review on Biofilm Forming Microbials in Cases of Bovine Mastitis and its Impact on Treatment. https://www.researchgate.net/publication/363252492_Review_on_Biofilm_Forming_Microbials_in_Cases_of_Bovine_Mastitis_and_its_Impact_on_Treatment

Huseby, M., Shi, K., Kent Brown, C., Digre, J., Mengistu, F., Keun, S. S., Bohach, G. A., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H., y Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 189(23). https://doi.org/10.1128/JB.00741-07

ID (Investigación Diagnóstica). 2020. Laboratorio de reactivos para diagnóstico. https://idlab.com.mx/catalogos/investigacion-diagnostica/dialab/

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (2021). Aspectos geográficos - Sinaloa. En Inegi. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_25.pdf

Insua, D., Pérez García, C., y Prado, E. A. (2008). Evaluación epizootiològica de la mastitis bovina en cuatro vaquerias (Epizootiological evaluation of bovine mastitis in four dairy farms). REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, IX(7). https://www.redalyc.org/pdf/636/63617061002.pdf

Jenkins, S. N., Okello, E., Rossitto, P. V., Lehenbauer, T. W., Champagne, J., Penedo, M. C. T., Arruda, A. G., Godden, S., Rapnicki, P., Gorden, P. J., Timms, L. L., y Aly, S. S. (2019). Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. PeerJ, 2019(5). https://doi.org/10.7717/peerj.6749

Khasapane, N. G., Byaruhanga, C., Thekisoe, O., Nkhebenyane, S. J., y Khumalo, Z. T. H. (2023). Prevalence of subclinical mastitis, its associated bacterial isolates and risk factors among cattle in Africa: a systematic review and meta-analysis. BMC Veterinary Research, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12917-023-03673-6

Kjelleberg, S., y Givskov, M. (2009). The Biofilm Mode of Life. Biofilm.http://www.caister.com/openaccess/pdf/biofilm2.pdf

Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., Brito, M. A. V. P., Fietto, L. G., y Ribon, A. de O. B. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. Veterinary Microbiology, 160(1–2). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.025

Kouidhi, B., Zmantar, T., Hentati, H., y Bakhrouf, A. (2010). Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in Staphylococcus aureus associated to dental caries. Microbial Pathogenesis, 49(1–2). https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.03.007

Krishnamoorthy, P., Goudar, A. L., Suresh, K. P., y Roy, P. (2021). Global and countrywide prevalence of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle and buffaloes by systematic review and meta-analysis. Research in Veterinary Science, 136. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.021

Kromker, V. (2014). Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. Clinical Microbiology: Open Access, 03(04). https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000157

Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., y Hasnain, S. E. (2017). Biofilm: Survival and defense strategy for pathogens. En International Journal of Medical Microbiology (Vol. 307, Número 8). https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016

Lasa, I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. En International Microbiology (Vol. 9, Número 1). https://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/10711

Lasserre, M., Fresia, P., Greif, G., Iraola, G., Castro-Ramos, M., Juambeltz, A., Nuñez, Á., Naya, H., Robello, C., & Berná, L. (2018). Whole genome sequencing of the monomorphic pathogen *Mycobacterium bovis* reveals local differentiation of cattle clinical isolates. BMC Genomics, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12864-017-4249-6

Lee, S. H. I., Mangolin, B. L. C., Gonçalves, J. L., Neeff, D. V., Silva, M. P., Cruz, A. G., y Oliveira, C. A. F. (2014). Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. Journal of Dairy Science, 97(3). https://doi.org/10.3168/jds.2013-7387

León-Galván, M. F., Barboza-Corona, J. E., Lechuga-Arana, A. A., Valencia-Posadas, M., Aguayo, D. D., Cedillo-Pelaez, C., Martínez-Ortega, E. A., & Gutierrez-Chavez, A. J. (2015). Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central mexico. BioMed Research International, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/615153

Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. En Nature Reviews Microbiology (Vol. 5, Número 1). https://doi.org/10.1038/nrmicro1557

Loeb, L. (1903). The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood. The Journal of Medical Research, 10(3). https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2105975

Lu, T. K., y Collins, J. J. (2007). Dispersing biofilm with engineered enzymatic bacteriophage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(27). https://doi.org/10.1073/pnas.0704624104

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., y Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS Pathogens, 5(3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354

Mera Andrade, R., Muñoz Espinoza, M., Artieda Rojas, J. R., Ortíz Tirado, P., González Salas, R., y Vega Falcón, V. (2017). Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche -. Revista Electrónica de Veterinaria, 18(11). https://www.redalyc.org/pdf/636/63653574004.pdf

Milanov, D., Prunić, B., Velhner, M., Todorović, D., y Polaček, V. (2015). Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of *Escherichia coli* strains isolated from milk of cows with mastitis. Acta Veterinaria, 65(2). https://doi.org/10.1515/acve-2015-0017

Miron, J., Ben-Ghedalia, D., y Morrison, M. (2001). Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. En Journal of Dairy Science (Vol. 84, Número 6). https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2

Moreno, J., Diana, L., Martínez, M., Iribarnegaray, V., y Puentes, R. (2025). Comprehensive analysis of antimicrobial resistance, biofilm formation and virulence factors of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Heliyon*, *11*(4). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42749

Møretrø, T., y Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(5). https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283

Neely, A. N., y Maley, M. P. (2000). Survival of enterococci and *Staphylococci* on hospital fabrics and plastic. Journal of Clinical Microbiology, 38(2). https://doi.org/10.1128/jcm.38.2.724-726.2000

Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Lara, P. D., Torres-Rodríguez, F., Loeza-Ángeles, H., Mascot-Chiquito, N., Sánchez-Baca, S., & López-Meza, J. E. (2008). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 94(2). https://doi.org/10.1007/s10482-008-9230-6

Olanbiwoninu, A. A., y Popoola, B. M. (2023). Biofilm and their impact on the food industry. En Saudi Journal of Biological Sciences (Vol. 30, Número 2). https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103523

Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F., y Vilela, C. L. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Veterinary Microbiology, 118(1–2). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.008

Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., y Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. Canadian Journal of Veterinary Research, 66(2). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11989739/

Ortega-Peña, S., Martínez-García, S., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Diaz, M. E., y Cancino-Diaz, J. C. (2020). Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation. En Molecular Biology Reports (Vol. 47, Número 1). https://doi.org/10.1007/s11033-019-05139-1

Över, U., Tüç, Y., y Söyletir, G. (2000). Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: A rare isolate of human infection. Clinical Microbiology and Infection, 6(12). https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00153.x

Paharik, A. E., y Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. Microbiology Spectrum, 4(2). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0022-2015

Pech, V., Carvajal, M., y Montes, R. (2007). Impacto económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la zona centro del estado de yucatán. Tropical and Subtropiacl Agroecosystems, VII. https://www.redalyc.org/pdf/939/93970207.pdf

Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., y Jørgensen, E. (2021). Biofilm Research in Bovine Mastitis. En Frontiers in Veterinary Science (Vol. 8). https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810

Pereira, J., Pang, S., Borsje, C., Sleutels, T., Hamelers, B., y ter Heijne, A. (2022). Real-time monitoring of biofilm thickness allows for determination of acetate limitations in bio-anodes. Bioresource Technology Reports, 18. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101028

Pereyra, E. A. L., Picech, F., Renna, M. S., Baravalle, C., Andreotti, C. S., Russi, R., Calvinho, L. F., Diez, C., y Dallard, B. E. (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Veterinary Microbiology, 183. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002

Piechota, M., Kot, B., Frankowska-Maciejewska, A., Gruzewska, A., y Woźniak-Kosek, A. (2018). Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. BioMed Research International, 2018. https://doi.org/10.1155/2018/4657396

Pineda-Burgos, B. C., Catalán Nájera, J. C., Espinosa Rodríguez, M., Sabino López, J. E., y Vázquez Villamar, M. (2024). El impacto económico de la mastitis bovina en México. Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan, 12(1), 51–60. https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v12i1.539

Pinelli Saavedra, A., Perez-Morales, R., González-Rios, H., Amavizca-Nazar, A., Cinco-Moroyoqui, F., Wong-Corral, F., Iturralde-García, R., Borboa-Flores, J.,

Sánchez-Maríñez, R., Cortez-Rocha, M., Cinco-Moroyoqui, F., y Wong-Corral, F. (2022). Prevalencia y relación de mastitis con niveles séricos de vitaminas E y A y estatus microbiológico en vacas criollas doble propósito, en época de verano. Biotecnia, 24(1), 79–86. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i1.1552

Ponnuraj, K., Bowden, M. G., Davis, S., Gurusiddappa, S., Moore, D., Choe, D., Xu, Y., Hook, M., y Narayana, S. V. L. (2003). A “dock, lock, and latch” structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. Cell, 115(2). https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00809-2

Pyörälä, S., y Taponen, S. (2009). Coagulase-negative *Staphylococci*-Emerging mastitis pathogens. Veterinary Microbiology, 134(1–2). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S., y Hartigan, P. J. (2011). Veterinary Microbiology and icrobial Disease 2nd Edition. En Wiley-Blackwell (Vol. 2, Número 1). https://www.wiley.com/en-us/Veterinary+Microbiology+and+Microbial+Disease%2C+2nd+Edition-p-9781405158237

Raspanti, C. G., Bonetto, C. C., Vissio, C., Pellegrino, M. S., Reinoso, E. B., Dieser, S. A., Bogni, C. I., Larriestra, A. J., y Odierno, L. M. (2016). Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. Revista Argentina de Microbiología, 48(1). https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.12.001

Rosini, R., y Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: Influence of environmental conditions and implicated virulence factor. In Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (Vol. 5, Issue FEB). https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00006

Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C. R., Pantoja, J. C. F., Santos, M. V., Gonçalves, J. L., Fernandes Júnior, A., y Rall, V. L. M. (2021). Short communication: Association

between the accessory gene regulator (agr) group and the severity of bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus. Journal of Dairy Science, 104(3). https://doi.org/10.3168/jds.2020-19275

Ruegg, P. L., y Pantoja, J. C. F. (2013). Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 52(2 SPEC. ISSUE 2). https://www.jstor.org/stable/23631024

Salinas-Pérez, E., Guzmán-Rodríguez, J., y Gutiérrez-Chávez, A. (2024). Capacidad de formación de biofilm de Staphylococcus aureus multi - resistentes aislados de mastitis bovina. Ganaderia.com. https://www.ganaderia.com/destacado/capacidad-de-formacion-de-biofilm-de-staphylococcus-aureus-multi---resistentes-aislados-de-mastitis-bovina

San Martin, B., Kruze, J., Morales, M. A., Agüero, H., Leon, B., Esppinoza, S., Iragüen, D., Puga, J., y Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xa Región, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria, 34(2). https://doi.org/10.4067/s0301-732x2002000200008

Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., y Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. Journal of Clinical Microbiology, 45(9). https://doi.org/10.1128/JCM.00360-07

Schleifer, K.-H. and Bell, J.A. (2015). *Staphylococcus* [†,‡] . In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00569

Schönborn, S., Wente, N., Paduch, J. H., y Krömker, V. (2017). In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilm. Journal of Dairy Research, 84(2). https://doi.org/10.1017/S0022029917000218

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SADER]. (2024). Ganadería Bovina en México: Un Orgullo Nacional. gob.mx. https://www.gob.mx/agricultura/articulos/ganaderia-bovina-en-mexico-un-orgullo-nacional

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2022). Crece la producción lechera, pero enfrenta retos, uno principal está en la normatividad. https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crece-la-produccion-lechera-pero-enfrenta-retos-uno-principal-esta-en-la-normatividad-322012

Simojoki, H., Hyvönen, P., Plumed Ferrer, C., Taponen, S., y Pyörälä, S. (2012). Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative *Staphylococci* associated with the persistence and severity of intramammary infection? Veterinary Microbiology, 158(3–4). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.031

Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado [SINIIGA]. (2024). Estadística Padrón Ganadero Nacional Bovino. Padrón Ganadero Nacional (PGN). https://www.pgn.org.mx/EstadisticaPGNBovinos.pdf

Srey, S., Jahid, I. K., y Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. En Food Control (Vol. 31, Número 2). https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40(2). https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6

Sun, D., Accavitti, M. A., y Bryers, J. D. (2005). Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12(1). https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.93-100.2005

Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment. In Trends in Microbiology (Vol. 9, Issue 5). https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1

Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J. A., Matthews, S., Penades, J. R., Lasa, I., y Valle, J. (2016). *Staphylococcal Bap* Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. PLoS Pathogens, 12(6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005711

Téllez, S. Á., Chávez, A. J. G., Gómez, J. I. S., y Jiménez, E. C. (2002). Comparación del estado de salud de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. Veterinaria México, 33(4). https://www.redalyc.org/pdf/423/42333404.pdf

Tong, X., Barkema, H. W., Nobrega, D. B., Xu, C., Han, B., Zhang, C., Yang, J., Li, X., y Gao, J. (2025). Virulence of Bacteria Causing Mastitis in Dairy Cows: A Literature Review. *Microorganisms*, *13*(1), 167. https://doi.org/10.3390/microorganisms13010167

United States Department of Agriculture [USDA]. (2025). Livestock and Poultry: World Markets and Trade. En USDA Foreign Agricultural Service (Gov). Foreign Agricultural Service. https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf

Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penadés, J. R., y Lasa, I. (2012). Bap, a Biofilm Matrix Protein of *Staphylococcus aureus* Prevents Cellular Internalization through Binding to GP96 Host Receptor. PLoS Pathogens, 8(8). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002843

Vargas-Monter, J., Sifuentes-Saucedo, D. M., Vargas-López, S., Rodríguez-Ortega, L. T., y Noguez-Estrada, J. (2021). Impacto Económico De La Mastitis En La Lechería Familiar Del Valle Del Mezquital Hidalgo. Revista Mexicana de Agroecosistemas, 8, 172-178. https://revistaremaeitvo.mx/index.php/remae/article/view/216/196

Varhimo, E., Varmanen, P., Fallarero, A., Skogman, M., Pyörälä, S., Iivanainen, A., Sukura, A., Vuorela, P., y Savijoki, K. (2011). Alpha- and β-casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. Veterinary Microbiology, 149(3–4). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.010

Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., y Venkitanarayanan, K. S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Veterinary Microbiology, 92(1–2). https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7

Viana, D., Blanco, J., Tormo-Más, M. Á., Selva, L., Guinane, C. M., Baselga, R., Corpa, J. M., Lasa, Í., Novick, R. P., Fitzgerald, J. R., y Penadés, J. R. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. Molecular Microbiology, 77(6). https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07312.x

Wagenvoort, J. H. T., Sluijsmans, W., y Penders, R. J. R. (2000). Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. Journal of Hospital Infection, 45(3). https://doi.org/10.1053/jhin.2000.0757

Wald, R., Hess, C., Urbantke, V., Wittek, T., y Baumgartner, M. (2019). Characterization of *staphylococcus* species isolated from bovine quarter milk samples. Animals, 9(5). https://doi.org/10.3390/ani9050200

Webb J. 2009. Differentiation and dispersal in biofilm. Bacterial Biofilm Formation and Adaptation, 1996. https://www.caister.com/openaccess/pdf/biofilm9.pdf

Wolter, W. Castañeda, H. y Kloppert, B. Zschöck, M. (2004). Mastitis bovina (1.ª ed.). Grupo editorial: Editorial Universidad de Guadalajara. https://editorial.udg.mx/gpd-mastitis-bovina.html

Xia, G., y Wolz, C. (2014). Phages of Staphylococcus aureus and their impact on host evolution. Infection, Genetics and Evolution, 21. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.022

Zhao, A., Sun, J., y Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. En Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (Vol. 13). https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947