



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Veterinarias - Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Staphylococcus aureus*  
AISLADOS DESDE LECHE DE ESTANQUE DE REBAÑOS LECHEROS DE LAS  
PROVINCIAS DE BIOBÍO Y ÑUBLE, REGIÓN DEL BIOBÍO, CHILE**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias  
con Mención en Higiene y Tecnología de los Alimentos

PAULINA ANDREA PACHA BECERRA  
CHILLÁN-CHILE  
2015

Profesor Guía: Marcos Muñoz Domon Ph.D.  
Dpto. de Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Staphylococcus aureus*  
AISLADOS DESDE LECHE DE ESTANQUE DE REBAÑOS LECHEROS DE LAS  
PROVINCIAS DE BIOBÍO Y ÑUBLE, REGIÓN DEL BIOBÍO, CHILE**

Aprobada por:

Marcos Muñoz Domon  
Médico Veterinario, Ph.D.

---

Profesor Guía

Pedro Rojas García  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

---

Evaluador Interno

Pamela Williams Salinas  
Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs. Agrarias

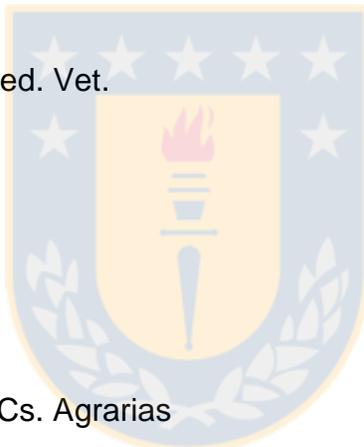
---

Evaluador Externo

Juana López Martín  
Médico Veterinario, M. Sc.

---

Directora de Programa



## TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de contenidos	iii
Lista de figuras de figuras	iv
Lista de tablas	v
Lista de abreviaciones	v
I. Resumen	1
II. Summary	2
III. Introducción	3
IV. Hipótesis y objetivos	16
V. Materiales y método	17
VI. Resultados	24
VII. Discusión	29
VIII. Conclusiones	35
IX. Bibliografía	36



## LISTA DE FIGURAS

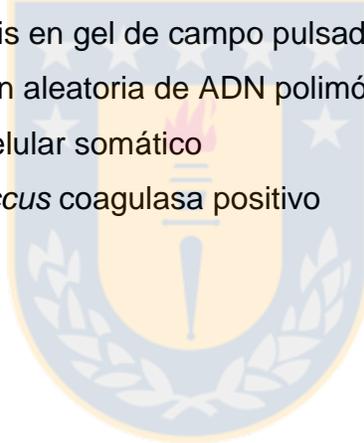
Figura 1	Características morfológicas evaluadas en la identificación de colonias de <i>S. aureus</i> en cultivo aeróbico en agar sangre con esculina.	20
Figura 2	Amplificación de producto PCR de 1318 pares de bases (pb) especie específico para <i>Staphylococcus aureus</i> en gel de agarosa de 1,5%.	26
Figura 3	Patrones de bandas de aislados de <i>S. aureus</i> obtenidos por amplificación aleatoria de ADN polimórfico identificados desde muestras de leche de granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble.	28
Figura 4	Comparación de patrones de bandas de aislados de <i>S. aureus</i> obtenidos del Estado de Nueva York; Estados Unidos (A) (Extraído de Gurjar <i>et. al</i> , 2012) y Provincias del Biobío y Ñuble; Chile (B) utilizando RAPD-PCR con primer AUG3.	34

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Factores de virulencia y su mecanismo de acción identificados en <i>Staphylococcus aureus</i> .	7
Tabla 2	Factores de virulencia codificados desde elementos extracromosomales identificados en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	9
Tabla 3	Estudios de identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por cultivo bacteriológico realizados en la región del Biobío entre los años 1963 y 2011.	15
Tabla 4	Granjas lecheras, muestras de leche de estanque y número de vacas en ordeño de granjas evaluadas para la diversidad genética de <i>Staphylococcus aureus</i> en las provincias de Biobío y Ñuble.	18
Tabla 5	Niveles de identificación de aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> desde muestras de leche de estanque de operaciones lecheras de la provincia de Biobío y Ñuble.	25

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>API</b>	Índice analítico de perfil
<b>ASE</b>	Agar sangre con esculina
<b>ATCC</b>	Colección americana de cultivos tipo
<b>IMI</b>	Infecciones intramamarias; siglas por su nombre en inglés <i>intramammary infection</i>
<b>MLST</b>	Tipificación multilocus de secuencias
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PME</b>	Procedimientos microbiológicos estándar.
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<b>RAPD</b>	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
<b>RCS</b>	Recuento celular somático
<b>SCP</b>	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo



## I. RESUMEN

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un importante microorganismo causante de infecciones intramamarias (IMI) en rebaños lecheros del mundo, siendo frecuentemente aislado desde leche de estanque. Las cepas de *S. aureus* causantes de IMI pueden variar tanto dentro como entre granjas lecheras. En las provincias chilenas de Biobío y Ñuble *S. aureus* ha sido aislado tradicionalmente desde muestras desde leche de estanque utilizando procedimientos microbiológicos estándar (PME). Técnicas de diagnóstico molecular permiten aumentar la especificidad de identificación de cepas de *S. aureus* y distinguir genótipicamente subespecies utilizando métodos de tipificación molecular. El objetivo de la presente investigación fue identificar y evaluar la diversidad genética de *S. aureus* desde muestras de leche de estanque aislados de las provincias del Biobío y Ñuble. Un total de 115 muestras de leche de estanques de 107 granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble fueron analizadas. Los aislados de *S. aureus* fueron identificados utilizando MSP complementado con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La diversidad genética de los aislados de *S. aureus* fue evaluada utilizando la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR) y el índice de discriminación de Simpson (SID). Un total de 89 aislados de *S. aureus* fueron identificados utilizando MSP y PCR desde 64 muestras de leche positivas de 62 granjas. Todos los aislados identificados correspondieron a cepas diferentes de *S. aureus*, indicando que no existe dominancia de cepas en muestras de leche de estanque de las provincias de Biobío y Ñuble (SID=1). En cada muestra de leche evaluada se identificaron 1, 2, 3 y hasta 4 cepas diferentes de *S. aureus*; identificándose que un 67,7% (n=42) de muestras presento sólo una cepa de *S. aureus*. La variada diversidad genética de *S. aureus* sugiere que estrategias de control y prevención deben estar dirigidas al patrón epidemiológico de la o las cepas presentes de cada granja lechera de las provincias Biobío y Ñuble.

## II. SUMMARY

*Staphylococcus aureus* is an important microorganism that cause intramammary infections (IMI) and generate loss in milk production in a wide number of dairy herds. *Staphylococcus aureus* is frequently isolated in bacteriological culture from bulk tank milk samples. In different countries a wide *S. aureus* strains diversity has been described between and within dairy herds. In center-south provinces of Chile *S. aureus* has been identified by traditional culture from bulk tank milk samples; nevertheless molecular diversity of *S. aureus* strains is unknown. To differentiate phenotypical indistinguishable colonies DNA fingerprint bander pattern can be used. The objective of this study was to identify *S. aureus* and evaluate genetic diversity of their strains presents between and within bulk tank milk samples (BTM) from dairy herds from Biobío and Ñuble, Chile. A total of 115 BTM from 107 dairy samples were analyzed. *Staphylococcus aureus* identification was asses using traditional microbiological procedures and PCR species confirmation. Strain diversity was analyzed using Random Amplified Polimorfic DNA (RAPD-PCR) typing and Simpson Index Diversity was calculated. A total of 89 isolates were identified from 64 bulk tank milk samples from 62 dairy farms. The 89 isolates were identified as different strains; indicating a non-predominant strain of *S. aureus* present in bulk tank milk samples in dairy herds from center south region of Chile (SID=1). Within the dairy herds positive to *S. aureus* (culture-molecular) in 67.7% (n=45) a unique strain type was identified. The *Staphylococcus aureus* strains diversity identified between dairy herds from center south region of Chile suggest that prevention and control strategies should be focus on epidemiologic pattern of herd specific(s) strain(s).

### III. INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un microorganismo que genera infecciones intramamarias (IMI) en granjas lecheras de diferentes partes del mundo; incluyendo Chile (Capurro *et al.*, 2010; Olde *et al.*, 2010; Muñoz, 2011). Las IMI causan una disminución en la producción de leche alterando la estructura y el funcionamiento normal del alveolo mamario; afectando y modificando la proporción de los componentes de la leche (Kitchen, 1989; Barbano *et al.*, 2006). Las IMI permiten la salida desde la sangre al alveolo mamario de células de la línea blanca, enzimas lipolíticas y proteolíticas termo resistentes. Por una parte, la salida de células de la línea blanca provoca un aumento en el recuento celular somáticos (RCS) de la leche individual. De esta forma, las IMI causadas por *S. aureus* permiten el aumento de RCS de la leche de estanque del rebaño (Jayarao *et al.*, 2004; Barkema *et al.*, 2006; Olde *et al.*, 2006). Por otro lado, la salida de enzimas lipolíticas y proteolíticas, son capaces de generar cambios sensoriales de acidez y amargura en productos de leche fluida que han pasado por procesos térmicos de pasteurización disminuyendo su vida útil (Barbano *et al.*, 2006).

Las IMI son causadas principalmente por microorganismos bacterianos que ingresan por el esfínter del pezón hasta el alveolo mamario, colonizando la glándula mamaria. Las IMI se han clasificado en 2 grupos principales al considerar el origen bacteriano en: contagiosas y ambientales (Blowey and Edmonson, 2010). *Staphylococcus aureus* se ha clasificado como causante de IMI de origen contagioso y ocurriendo su transmisión principalmente durante la rutina de ordeño desde una glándula mamaria infectada a una glándula mamaria sana (Maroney, 2005; Barkema *et al.*, 2009, Blowey and Edmonson, 2010). La transmisión de la bacteria se postula sucede a través de un vector que puede corresponder entre otros: a las manos del ordeñador, las toallas de limpieza mamaria y/o las unidades de ordeño (Blowey and Edmonson, 2010; Havery *et al.*, 2008). La glándula mamaria infectada puede eliminar a través de la leche cargas variables de *S. aureus* durante periodos intermitentes de tiempo. Por lo anterior, una glándula mamaria que cursa con una IMI causada por *S. aureus* es considerada el mayor reservorio de este microorganismo dentro del rebaño (Sears *et al.*, 1990; Blowey and Edmonson,

2010). La tasa de recuperación de IMI causadas por *S. aureus* varía en cada rebaño lechero y se relaciona entre otras con las características del animal afectado; número de lactancias y cuarto mamario afectado, la cronicidad de la infección y características de virulencia de la cepa de *S. aureus* causante de la IMI entre otros (Barkema *et al.*, 2006).

### ***Staphylococcus aureus* en leche de estanque**

*Staphylococcus aureus* es frecuentemente aislado desde muestras de leche individuales, compuestas de cuartos mamaros y de estanque en rebaños afectados con IMI causadas por este microorganismo (Oliver *et al.*, 2004). Existen principalmente 2 fuentes de microorganismos presentes en la leche de estanque. La primera corresponde a microorganismos presentes en la máquina de ordeño que son arrastrados al estanque durante el proceso de recolección de leche (Oliver *et al.*, 2005). La presencia de estos microorganismos es prevenida utilizando protocolos de sanitización en la máquina post ordeño, sin embargo fallas en el protocolo permiten el establecimiento bacterias y una posible formación de biopelículas (Latorre *et al.*, 2010). En la provincia de Ñuble se ha descrito el hallazgo de biopelículas en la máquina de ordeño por fallas en el correcto volumen del agua de lavado y temperaturas no óptimas (Latorre and Munoz, 2015). La segunda fuente de microorganismos presentes en la leche de estanque corresponde a glándulas mamaras que cursan con una IMI y eliminan al patógeno a través de la leche (Oliver *et al.*, 2005; Blowey and Edmonson, 2010). *Staphylococcus aureus* es frecuentemente aislado desde muestras de leche de estanque de rebaños afectados con IMI causadas por *S. aureus* (Oliver *et al.*, 2005).

### **Características microbiológicas de *S. aureus***

*Staphylococcus aureus* pertenece al Phylum II Firmicutes del dominio *Bacteria*; clase III *Bacilli*; orden I *Bacillales*; Familia V *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus* (Garrity, 2004). Es una bacteria gram positiva, con forma cocacea que normalmente mide de 0,8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, anaerobia facultativa, capaz de obtener energía fermentando glucosa, manitol y lactosa. Al género *Staphylococcus*

se le atribuye su nombre debido a sus 3 planos de división celular lo que genera agrupaciones bacterianas semejantes a un racimo de uvas (griego *Syle* =racimo y *kokkos*=grano) (Fuello, 2005). La presencia de pigmentos carotenoides en la membrana celular *S. aureus* le confieren una coloración dorada a sus colonias. *Staphylococcus aureus* capaz de producir las enzimas catalasa y coagulasa. La enzima coagulasa es utilizada en la identificación microbiológica para diferenciar *S. aureus* de otras especies. La coagulasa permite transformar el fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo en una capa de fibrina alrededor de *S. aureus* (Fuello, 2005; Blowey and Edmonson, 2010). Esta capa de fibrina le confiere a *S. aureus* una barrera física frente a la acción del sistema inmune y antibióticos.

El género *Staphylococcus* es capaz de producir 4 tipos de toxinas denominadas hemolisinas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  están presentes en cepas de *S. aureus* y son una característica hemolítica observable al cultivo en agar sangre. Las hemolisinas gamma y delta están presente en las especies de *Staphylococcus* coagulasa positivo; sin embargo esta característica hemolítica no es observable al cultivo en agar sangre (Hirtch and Biberstein, 2004).

### **Identificación de *S. aureus* desde muestras de leche**

La identificación de *S. aureus* desde muestras de leche es realizada utilizando procedimientos microbiológicos estándar (PMS) descritos en el Consejo Nacional de las Mastitis de los Estados Unidos y contemplan: a) morfología típica de la colonia en agar sangre, que incluyan patrones de hemólisis- $\alpha$ , hemólisis- $\beta$  ó hemólisis  $\alpha$ - $\beta$ , b) respuesta positiva a las pruebas de catalasa c) respuesta positiva a la prueba de coagulasa. La implementación de pruebas usualmente fenotípicas es complementada a los procedimientos estándar de identificación para *S. aureus* (Bautista-Trujillo *et al.*, 2013). No obstante, la respuesta a pruebas fenotípicas en la identificación de especies de *Staphylococcus* coagulasa positivo (CPS) identificados en muestras de leche puede ser variable (Biberstein *et al.*, 1984; Larsen *et al.*, 2002; Boerlin *et al.*, 2003, Taponen *et al.* 2012). Usualmente, aislados clasificados por colonias morfológicas características de *S. aureus* y positivos a la prueba de catalasa son clasificados indistintamente como *S. aureus* (Roberson *et al.*

1998; Oikinomou et al 2012). Esto debido a que un bajo número de aislados de SCP diferentes a *S. aureus* ha sido reportado de muestras de leche utilizando MSP y pruebas fenotípicas adicionales (Phillips et al 1981, Biberstein et al 1988, Robertson 1994). No obstante, especies de SCP tales como *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermedius* han sido identificados desde muestras de de leche infecciones intramamarias identificadas (Phillips et al, 1981; Capurro et al, 1998, Oikinomou et al, 2012). Hoy en día existen metodologías de PCR protocolos que complementan el diagnóstico microbiológico se describen para la identificación de *S. aureus*.

Por otro lado, es importante interpretar que el crecimiento negativo en placas de agar sangre de muestras de no indica que predice que considerar *S. aureus* es eliminado de forma i patrón intermitente de eliminación descrito para a través de la leche se considera que una muestra de leche negativa al cultivo bacteriológico no asegura una glándula mamaria sana (Sears et al, 1990). Se considera que 1/3 de los animales con IMI causadas por *S. aureus* son negativos a cultivo microbiológico debido a la eliminación (Blowey and Edmonson, 2010). Un aumento en la frecuencia de toma de muestras en ordeñas diferentes aumenta las probabilidades de aislar *S. aureus* (Maroney, 2005).

### **Factores de virulencia de *S. aureus***

Los factores de virulencia son elementos estructurales o productos extracelulares sintetizados por la bacteria que permiten a la bacteria establecerse dentro del huésped y causar una enfermedad. *Staphylococcus aureus* posee diversos factores de virulencia que permiten su establecimiento dentro de la glándula mamaria y causar una IMI (Tabla 1) (Hibbitt et al., 1969; Frost, 1975; Sutra and Poutrel, 1994). Entre cepas de *S. aureus* pueden existir variaciones en los factores de virulencia presentes que permitirían que una cepa sea mayormente virulenta respecto a otra. Entro otras, se han descrito cepas de *S. aureus* capsuladas que evaden la respuesta inmune, capaces de sobrevivir y multiplicarse intracelularmente, cepas capaces de sintetizar formar biopelículas y/o toxinas (Almeida et al., 1996; Gresham et al., 2000; Cucarella et al., 2004, Vancraeynest et al., 2004; Fox et al.,

**Tabla 1.** Factores de virulencia y mecanismo de acción descritos en *Staphylococcus aureus*\*

Factor de Virulencia	Mecanismo de acción	Referencia
Ácidos teicoicos	Antifagocitario	Weidenmaier <i>et al.</i> , 2004
Proteína A	Unión al fragmento constante de Inmunoglobulina G	Sutra and Poultrrel, 1994 Tufano <i>et al.</i> , 1990.
Proteínas de unión	Adhesión bacteriana a fibronectina y colágeno  Inhibición del complemento.	Sutra and Poultrrel, 1994. Hammel <i>et al.</i> , 2007.
Cápsula	Inhibición de la opsonización Estallido respiratorio en neutrófilos.	Wilkinson <i>et al.</i> , 1979. Kampen <i>et al.</i> , 2005.
Prot. ligada a penicilina	Impide la acción de $\beta$ -lactámicos.	Deurenberg <i>et.al.</i> , 2007
Biopelículas	Persistencia y resistencia antibiótica.	Singh <i>et.al.</i> , 2009.
Coagulasa	Activación de fibrinógeno a fibrina; formación de absceso.	Phonimdaeng <i>et al.</i> , 1990.
Estafiloquinasa	Evasión de defensinas.	Jin <i>et al.</i> , 2004.
Hialuronidasa	Invasión de tejido.	Hynes and Walton, 2000.
Lipasas	Invasión – colonización.	Rollof <i>et al.</i> , 1988.
Termonucleasas	Hidrólisis de ADN.	Brakstad <i>et al.</i> , 1993.
Hemolisinas	Ruptura de membranas celulares.	Martínez <i>et al.</i> 2005.
Leucocidinas	Alteración en permeabilidad celular	Cribier <i>et al.</i> , 1992.
Superantígenos	Estimulación masiva de linfocitos T	Choi <i>et al.</i> , 1989.
Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria.	Jarraud <i>et al.</i> , 2001.
Bacteriocinas	Acción bactericida.	Gagliano and Hinsdill, 1970

\* Modificado de Fuello, 2005.

2005). Los factores de virulencia se encuentran codificados genéticamente; existiendo una alta diversidad de genotipos de *S. aureus* identificados dentro y entre granjas lecheras (Zadoks *et al.*, 2002).

### **Diversidad genética de *S. aureus* presente en el rebaño lechero**

La diversidad genética evalúa la variación entre secuencias nucleótidas de organismos (Hartwel *et al.*, 2000). Una secuencia nucleótida específica, correspondiente a un gen, está ubicada en una sección específica del cromosoma de ADN codificando una característica particular de un organismo (Harrison *et al.*, 2001). La célula bacteriana contiene su información genética cromosomal como una hebra doble de ADN que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática en una zona denominado nucleón. La mayor parte de las bacterias posee un cromosoma único, corto y circular. No obstante, muchas bacterias incluyendo cepas de *S. aureus* poseen elementos extracromosomales de ADN tales como plásmidos, transposones (compuestos, simples y conjugativos como islas genómicas), profagos y cassettes de integrones (Tabla 2) (Madigan *et al.*, 2000; Hirtch and Biberstein, 2004). El genoma cromosomal de *S. aureus* es de aproximadamente 2.8 Mpb; variando de acuerdo a la cepa. El tamaño del genoma puede aumentar si la cepa posee plásmidos o algún elemento móvil (Holden *et al.*, 2004; Sanger Institute, 2012).

En medicina humana el desarrollo rápido de resistencia antibiótica de cepas de *S. aureus* frente a tratamientos con penicilina. durante los años 1940 permite evidenciar la capacidad de adaptación de esta especie bacteriana frente a condiciones adversas. La compleja composición del ADN de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA) describe el potencial de variabilidad genética y virulencia de algunos clones de *S. aureus* (Deurenberg *et al.*, 2006). En el rebaño lechero cepas de *S. aureus* genótipicamente diferentes han sido aisladas e identificadas desde muestras de leche individuales, leche de estanque, piel del pezón, manos del ordeñador y la línea de leche entre otros (Zadoks *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005). La vinculación de cepas de *S. aureus* extramamarias con cepas causantes de IMI aún es controversial. Por un lado existen grupos de

**Tabla 2.** Factores de virulencia codificados desde elementos extracromosomales identificados en cepas de *Staphylococcus aureus*

Codificación	Elemento	Referencia
Plásmido	* Toxina SE D **sTE B	Zhang <i>et al.</i> , 1998.
Transposón conjugativo	*SE: B, C, K, M ***TSST-1.	Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001. Lindsay <i>et al.</i> , 1998.
Profagos	**STE A *SE: A y E.	Yoshizawa <i>et al.</i> , 2000.
Cassette cromosomal	****SCC mec ****SCC cap	Deurenberg <i>et al.</i> , 2006 Loung <i>et al.</i> , 2002.

\*SE: Enterotoxina estafilocócica.

\*\*sTE: Toxina Exfoliativa.

\*\*\*TSST: Toxina del síndrome del shock tóxico.

\*\*\*\*SCC : Cassette cromosomal estafilocócico.

investigación que han identificado consistentemente mismas cepas extramamarias e intramamarias (Havery *et al.*, 2008). Por otro lado, existen estudios que no han identificado consistencia entre cepas (Zadoks *et al.*, 2002). No obstante, un grupo intercontinental de científicos ha consensado que en el rebaño una o un limitado número de cepas de *S. aureus* son las causantes de IMI afectando a múltiples animales. Así mismo es posible encontrar cepas de *S. aureus* causantes IMI con una baja prevalencia o incidencia dentro del rebaño (Zadoks *et al.*, 2011).

### **Subtipificación de especies de *S. aureus***

La diversidad de cepas de *S. aureus* con características variables generó la importancia en la agrupación como subespecie con características específicas en común. En los años 60 se realizó la primera clasificación de subespecie de *S. aureus* con fines epidemiológicos en la identificación de la casuística de cepas de *S. aureus* con resistencia a antibióticos beta-lactámicos dentro y entre hospitales. El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y perfiles de secuencias genéticas de aislados de *S. aureus* han permitido identificar y clasificar características específicas dentro del genoma; permitiendo relacionar diferentes cepas de *S. aureus* (Smith *et al.*, 2005). Las técnicas moleculares hoy en día son una herramienta básica para el desarrollo de investigaciones epidemiológicas que permiten entender el comportamiento y evolución de diferentes cepas de *S. aureus* (Enright *et al.*, 2000).

### **Epidemiología molecular en rebaños lecheros.**

La epidemiología molecular estudia los determinantes de salud, enfermedad o productividad en poblaciones animales, plantas o humanas a través del uso de técnicas de diagnóstico (Zadoks and Schukken, 2006). En la medicina veterinaria la epidemiología molecular ha sido utilizada principalmente en la caracterización genómica de subespecies de microorganismos relacionándolas con posibles vías de transmisión, interacción biológica y/o características de virulencia (Zadoks *et al.*, 2011).

Las investigaciones de epidemiología molecular en medicina veterinaria están basadas principalmente en métodos de tipificación molecular comparativa y métodos de tipificación de librería. Los métodos moleculares de tipificación comparativa basan el análisis de sus resultados en la comparación de patrones de banda electroforéticos entre microorganismos. De esta forma un método molecular comparativo permite la comparación de aislados de *S. aureus* dentro de un rebaño y entre rebaños (Zadoks and Schukken, 2006; Zadoks *et al.*, 2011). No obstante, utilizando métodos de tipificación comparativa no es posible determinar la fuente de origen de un aislado de *S. aureus* de una muestra de leche. Los métodos de tipificación de librería secuencian genes específicos, microensayos de genes de virulencia y/o secuencian genes completos de microorganismos generando resultados de significado universal independiente del tiempo, lugar o quién los realizo. Los métodos de tipificación de librería permiten discriminar la fuente de origen de *S. aureus*.

La selección de las técnicas de diagnóstico utilizada en un estudio de tipificación de un microorganismo se basa principalmente en la sensibilidad y especificidad de la prueba, costos, facilidad de uso y tiempo de desarrollo. El poder de discriminación de una prueba, habilidad un método de diferenciar entre cepas, es cuantificado utilizando el índice de diversidad de Simpson.. El índice de la diversidad de Simpson, conocido también como índice de la diversidad de las especies o índice de dominancia, indica la probabilidad que un sistema de identificación asignará diferente tipificación a dos cepas que no están relacionadas. El poder de discriminación de un método fenotípico puede ser mejorado al incluir técnicas como por ejemplo de pruebas bioquímicas y/o anticuerpos; entre otros. Los resultados de un estudio molecular son altamente dependientes del poder de discriminación del método de tipificación seleccionado (Zadoks and Schukken, 2006).

### **Definiciones de aislados, cepa y clon**

Durante la subtipificación de un microorganismo la definición clara entre los conceptos de aislado, cepa y clon es necesaria. Los aislados son cultivos puros presumiblemente derivados de un microorganismo; por ejemplo una colonia de *S.*

*aureus* obtenida desde una muestra de leche corresponde a un aislado. Una cepa corresponde a un aislado o grupos de aislados distinguidos unos de otros aislados por sus características fenotípicas o genotípicas. Una cepa de *S. aureus* correspondería por ejemplo a una cepa de *S. aureus* resistente a un antimicrobiano como es el caso de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA) y *Staphylococcus aureus* Meticilino sensible. Los clones corresponden a la progenie directa en la cadena de replicación de un ancestro común. Los clones de *S. aureus* son identificables mediante técnicas de tipificación molecular de librería que presentan resultados altamente reproducibles e interpretables a nivel mundial como por ejemplo la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y tipificación de locus de secuencias (MLST) (Zadoks and Schukken, 2006).

#### **Tipificación de *S. aureus* causante de IMI a través de epidemiología molecular**

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos intramamarios mayormente investigados por métodos moleculares en granjas lecheras (Zadoks *et al.*, 2011). En la identificación de *S. aureus* en granjas lecheras se han utilizadas técnicas de tipificación tales como: ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tipificación multilocus de secuencias (MLST), tipificación por el gen *spa* codificador de proteína A, gen de coagulasa, locus múltiples de número variable tándem (MLVA), microarreglos, comparaciones completas de genoma y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR) (Zadoks *et al.*, 2011). Técnicas de tipificación de librería, tales como PFGE permiten discriminar entre diferentes tipos de cepas de *S. aureus* presentes en la granja lechera (Zadoks and Schukken, 2006). Protocolos de diagnóstico de técnicas moleculares para *S. aureus* identificados desde leche han sido desarrolladas en los últimos 15 años (Zadoks *et al.*, 2000). El RAPD-PCR, como técnica comparativa, permite evaluar la relación genética existente entre cepas de *S. aureus*. A través de esta técnica, una secuencia de oligonucleótidos (*primers*) de alrededor de 10 pb inespecífica, que genera patrones de banda de ADN variables y distinguibles entre cepas diferentes. La técnica de RAPD-PCR ha sido reportada como una técnica rápida y de

razonable poder de discriminación para la subtipificación de cepas de *S. aureus* (Gurjar et al., 2011; Gurjar et al., 2012).

### **Aislados de *S. aureus* analizados por técnicas de diagnóstico molecular en Chile.**

En Chile las técnicas moleculares, comparativas o de librería, para la tipificación de cepas de *S. aureus* aislados desde muestras de leche han sido escasamente utilizadas. Un estudio de investigación realizado en los Estados Unidos (Smith *et al.* 2005), utilizando la técnica MLST, evaluó la relación genética entre los aislados de *S. aureus* provenientes de Estados Unidos, Reino Unido y Chile. En este estudio, 20 aislados de *S. aureus* provenientes de muestras de leche de 14 comunas de la zona sur de Chile fueron analizadas filogenéticamente. De los 20 aislados chilenos, 16 aislados se relacionaron filogenéticamente a un mismo tipo, identificado también en aislados de Estados Unidos. Los resultados de estos autores sugieren que este tipo proviene de un ancestro clonal de *S. aureus* que ha logrado una amplia distribución en diferentes lugares del mundo (Smith *et al.*, 2005).

### **Operaciones lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble, región del Biobío y *S. aureus*.**

La región del Biobío produce cerca de 9% de la leche recepcionada en las plantas lecheras en Chile. Las provincias de Biobío y Ñuble concentran un 52% de las vacas lecheras de la región del Biobío (Instituto Nacional de Estadística, 2007; Instituto Nacional de Innovación Agraria. 2007). Rebaños lecheros de estas provincias utilizan normalmente sistemas de estabulación mixtos; es decir las vacas se mantiene estabuladas o pastoreo de acuerdo a la curva de producción de forraje y condiciones bioclimáticas. *Staphylococcus aureus* es un patógeno intramamario que ha sido aislado e identificado por cultivo microbiológico desde muestras de leche de IMI y leche de estanque de rebaños lecheros de Chile (Tabla 3) (Lobos, 2011; Munoz, 2011).

En los últimos 25 años herramientas de diagnóstico y tipificación molecular han sido implementadas en la identificación de patógenos intramamarios en múltiples países

del mundo. En las provincias de la zona centro sur de Chile, Biobío y Ñuble, la evaluación de la diversidad genética de cepas de *S. aureus* aisladas desde leche no ha sido realizada. El resultado de este estudio permitirá identificar la existencia de un tipo predominante o no de cepas de *S. aureus* aislados desde leche de estanque de granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble.



**Tabla 3.** *Staphylococcus aureus* identificados por cultivo bacteriológico en estudios de investigación realizados en la región de Biobío durante el periodo de 1963 al 2011 (Adaptado de Lobos, 2011).

Provincia	%	Muestra	Autor	Año
Ñuble	58,5	Cuarto con IIM clínica	Quiñones	1963
Ñuble-Concepción	21,9	Cuarto*	Zemelman	1966
Ñuble	17,3	Cuartos clínicos y subclínicos	Marín	1975
Ñuble	59,4	Cuartos con IIM subclínicas	Pinilla	1990
Ñuble	75,0	Estanque	Guererro	1990
Arauco y Biobío	32,8	Cuartos con IIM subclínicas	Herrera	2001
Ñuble	22,5	Cuartos con IIM clínicas	León	2011

IIM: Infección intramamarias; definición determinada de acuerdo a cada estudio.

\* : No se indica si el tipo de muestra corresponde a cuarto con IIM clínica o subclínica.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

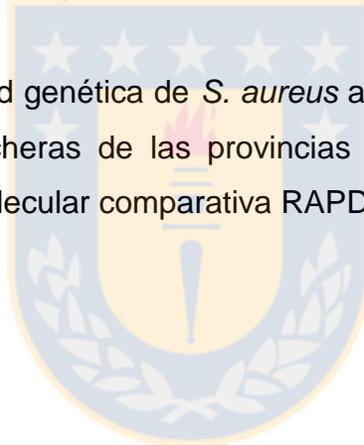
Existe un tipo predominante de cepa de *S. aureus* en leche de estanque de granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble.

#### **Objetivo general.**

Identificar y evaluar la diversidad genética de *S. aureus* aislados desde leche de estanque de granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble.

#### **Objetivos específicos.**

1. Evaluar la presencia de aislados de *S. aureus* en muestras leche de estanque de granjas lecheras de la provincia de Biobío y Ñuble utilizando procedimientos microbiológicos estándar complementados con PCR.
2. Evaluar la diversidad genética de *S. aureus* aislados desde muestras leche de estanque de granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble utilizando la técnica de tipificación molecular comparativa RAPD-PCR.



## V. MATERIALES Y MÉTODO

### **Granjas lecheras.**

Un total de 107 granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble fueron muestreadas para evaluar la diversidad genética de *S. aureus* durante el periodo de octubre de 2010 a diciembre de 2011 (Tabla 4). El número de vacas en ordeño fue proporcionado en 82 de las 107 granjas lecheras muestreadas; y suma un total aproximado de 24.500 animales (Tabla 4). De acuerdo al censo bovino lechero del año 2007 realizado por el Instituto Nacional de Estadística, el número de vacas en ordeño de las 82 granjas lecheras muestreadas representa aproximadamente un 65% de la población lechera de la provincia del Biobío y Ñuble (Tabla 4) (Instituto Nacional de Estadística, 2008).

### **Muestras de leche de estanque.**

Un total de 115 muestras de leche de estanque fueron recolectadas en las provincias de Biobío y Ñuble durante el periodo de estudio (Tabla 4). La recolección de muestras de leche de estanque fue realizada utilizando las recomendaciones del Consejo Nacional de Mastitis de los Estados Unidos (NMC) (Oliver *et al.*, 2004). En cada operación lechera se recolectó una muestra de leche de 100 mL de cada estanque en frascos estériles de recolección de muestras. Posterior a la recolección, las muestras fueron transportadas a temperatura de refrigeración y almacenadas a -20°C hasta su cultivo microbiológico en el Laboratorio de Calidad de Leche, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

### **Identificación microbiológica.**

Cultivo microbiológico: Las muestras de leche fueron descongeladas a temperatura ambiente e invertidas 20 veces para asegurar la mezcla de sus componentes (Jayarao *et al.*, 2004). Cada muestra de leche fue sembrada con una tórula estéril en una placa de agar sangre esculina (ASE) (Agar Sangre Esculina, Laboratorios Linsan, Chile) e incubada en condiciones aeróbicas a 37°C de 24 a 48 horas (Oliver *et al.*, 2004). Adicionalmente se incluyó en el cultivo

**Tabla 4.** Granjas lecheras, muestras de leche de estanque y número de vacas en ordeño de granjas evaluadas para la diversidad genética de *Staphylococcus aureus* en las provincias de Biobío y Ñuble.

Provincia	Número de		
	Granjas lecheras	Muestras de leche de estanque	Vacas en ordeño (% población de provincia <sup>**</sup> )
Biobío	69	77*	21623 <sup>a</sup> (73)
Ñuble	38	38	3005 <sup>b</sup> (37)
Total	107	115	24628 <sup>c</sup> (65)

\*4 granjas con 2 estanques de leche y 2 granjas con 3 estanques de leche.

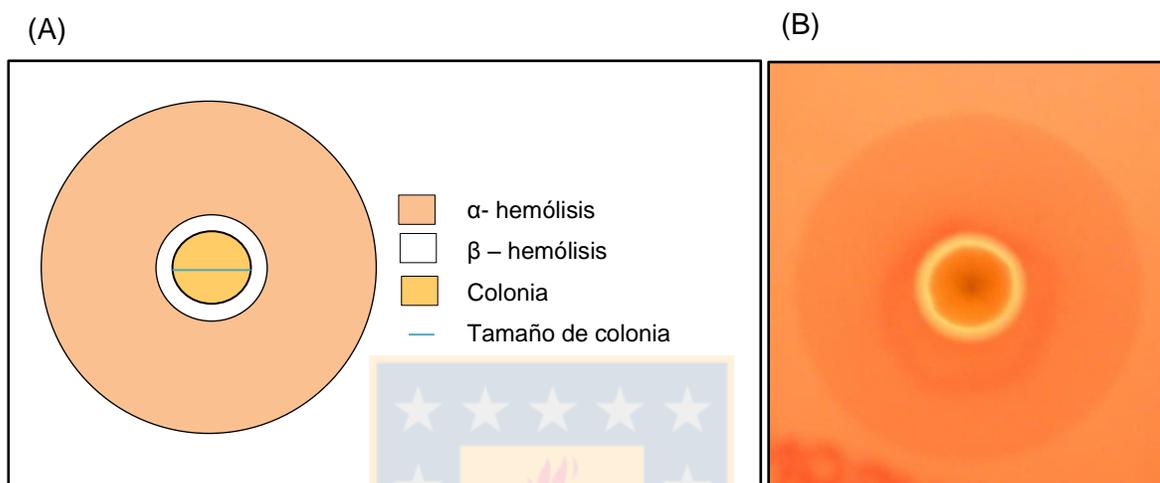
\*\*Porcentaje de población lechera calculada según la censo pecuario 2007 (Instituto Nacional de Estadística, 2008).

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> : Datos excluye número de vacas en ordeño de 13, 12 y 25 granjas lecheras respectivamente.

cultivó *S. aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus* sp., como control positivo un control negativo, respectivamente. Una placa de agar sangre esculina sin sembrar fue incluida como control del medio.

Identificación de colonias morfológicamente compatibles a *S. aureus* (M<sup>+</sup>): La identificación morfológica de los aislados de *S. aureus* fue basada en las recomendaciones del NMC se consideró colonias bacterianas de coloración blanco grisácea o amarillo dorada con halo de  $\alpha$ -hemólisis,  $\beta$ -hemólisis o  $\alpha$ - $\beta$ -hemólisis a su alrededor en cultivos de agar sangre (M<sup>+</sup>) (Oliver *et al*, 2004). Por cada tipo de colonia morfológicamente compatible con *S. aureus* una colonia se seleccionó en cada cultivo de ASE. La colonia fue sembrada con un aza estéril desechable de 1  $\mu$ L en una placa de agar sangre esculina e incubada en condiciones aeróbicas por 24 horas para obtener un cultivo puro de cada aislado. El tamaño de la colonia fue identificado como la distancia máxima de la colonia medida en línea recta pasando por su punto central a las 24 horas de cultivo aeróbico en cultivo ASE (Figura 1). Si al cultivo de una muestra de leche la proliferación de microorganismos en ASE a las 24 horas de sembrada no permite aislar colonia, la muestra de leche fue diluida 1:10 con agua destilada estéril.

Prueba de catalasa y coagulasa: Todos los aislados de M<sup>+</sup> fueron evaluados por las pruebas de catalasa (Bactident® Catalasa, Merck) y posteriormente coagulasa (Bactident® coagulasa, Merck). La prueba de catalasa fue positiva cuando la producción de burbujas al adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es producida. Para esta prueba, una colonia por aislado fue extendida sobre un portaobjeto portaobjeto y se adicionó una gota de Bactident® Catalasa (Merck). Por otra parte, la prueba de coagulasa es positiva cuando la enzima coagulasa forma coágulos en plasma. Para esta prueba, un asada de 10  $\mu$ L de colonia pura fue inoculada en 0,3ml de plasma de conejo (Bactident® coagulasa, Merck) e incubados a 37°C. La lectura de los resultados fue realizada cada 1 hora por 4 horas y posteriormente a las 24 h de ser inoculados.



**Figura 1.** Características morfológicas evaluadas en la identificación de colonias de *S. aureus* a las 24 horas de cultivo aeróbico en agar sangre con esculina. (A) Esquema de colonia morfológicamente compatible con *S. aureus* (B). Colonia morfológicamente compatible a *S. aureus* aislada desde muestra de leche de estanque de la provincia de Biobío, Chile.

Una colonia de cada aislado fue multiplicada en caldo cerebro corazón, mezclada con glicerol y posteriormente congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriores análisis.

### **Identificación molecular y evaluación de diversidad genética.**

Extracción de ADN La extracción de ADN fue realizada según el método de Adwan (2013) modificado. Los aislados fueron cultivados en 1/3 de placas de ASE en condiciones aeróbicas por 24 horas. Finalizado el periodo de incubación, se inocularon 10  $\mu\text{l}$  de colonias en 5 mL de caldo cerebro corazón a  $37^{\circ}\text{C}$  por 7 horas y se aplicó vortex para la resuspensión uniforme de las bacterias en el caldo. Posteriormente, se agregaron 1,5 mL del caldo, se centrifugo (Spectrofuge, Labnet) a 6000 G por 3 min y se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 3 veces para concentrar el pellet obtenido. El pellet se resuspendió en 1 mL de buffer Tris-Edta (TE) (TE-Buffer (1X) pH8.0, AppliChem, Germany). Posteriormente se agregaron 0,5 mL de agua ultrapura estéril (Ultra Pure™ Destilled Water, Invitrogen) y se llevó a  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 min en baño seco (AccuBlock™, Digital Dry Bath). Finalmente, se centrifugo la suspensión a 13000G por 5 min y se recolectaron 70  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en un nuevo eppendorf para ser almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

Identificación especie específica. La identificación de especie de *S. aureus* los aislados  $\text{M}^{(+)}\text{Ct}^{(+)}\text{Cg}^{(+)}\text{PCR}^{(+)}$  fueron evaluados al amplificar por PCR el segmento específico de la región ribosomal 30S de *S. aureus*. Se emplearon los primers y temperaturas de amplificación descritos por Riffon *et al.* (2001). Los primers utilizados corresponden a Sau 327: 5'-GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA-3' y Sau 1645: 5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT-3'. Las condiciones de amplificación para el set de primer Sau 327/1645 fueron a) 1 ciclo a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min b) 35 ciclos de:  $94^{\circ}\text{C}$  por 45 seg,  $64^{\circ}\text{C}$  por 1 min y  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min c) 1 ciclo a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min (Riffon *et al.*, 2001). La cepa de *S. aureus* ATCC 25923 fue analizado en conjunto con las muestras como control positivo de especie.

Diversidad genética de *S. aureus*. La diversidad genética de los aislados de *S. aureus* fue evaluada por RAPD-PCR utilizando la metodología descrita por Gurjar *et al.* (2012). El primer utilizado corresponde a AAG3: 5´-GGGACGGCCA-3´. Las condiciones de amplificación para AAG3 incluyen a) 1 ciclo de 95°C por 5 min b) 45 ciclos a 94°C por 30 seg, 35°C por 1 min y 72°C por 2 min. c) 1 ciclo de 5 min a 72°. La cepa de *S. aureus* ATCC 25923 fue analizado en conjunto con las muestras como control positivo de especie.

Visualización de fragmentos. Los segmentos amplificados por PCR y RAPD-PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de 1,5% y 1,8% por 45 min y 70 min respectivamente con Buffer TAE 0,5X a 105V. Posteriormente, la tinción de los fragmentos fue realizada en GelRed® 3X (Biotium, Hayward, CA) por 30 minutos y visualizados mediante UV transluminator (BioDoc-It® ImagingSystem, Benchtop, Reino Unido).

Criterios de inclusión. Patrones de banda de aislados con el mismo número y tamaño de fragmentos de ADN fueron identificados como cepa iguales, sin considerar intensidad de banda en el criterio. La lectura de los patrones de bandas de los aislados fueron realizados por dos observadores imparciales según lo determinado por Munoz and Zadoks (2007). Si no existe concordancia en la interpretación de los patrones de bandas electroforéticos de aislados; los procedimientos de extracción de ADN, PCR y electroforesis fueron repetidos según las recomendaciones de Munoz y Zadoks (2007).

### **Análisis estadístico.**

Los resultados cuantitativos de identificación morfológica y microbiológica de *S. aureus* fueron analizados utilizando métodos de estadística descriptiva. Diferencias entre las provincias de Biobío y Ñuble fueron evaluadas utilizando la prueba de Chi cuadrado o Fisher exact con un intervalo de confianza de un 95%. La diversidad genética de las cepas de *S. aureus* fue evaluada utilizando el Índice

de discriminación de Simpson con un intervalo de confianza de un 95% (Hunter and Gaston, 1988).

Índice de discriminación de Simpson (Hunter and Gaston, 1988):

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S ni(ni-1)}{N(N-1)}$$

$S$  = número de especies

$N$  = total de organismos presentes (o unidades cuadradas)

$n$  = número de ejemplares por especie.

### **Financiamiento.**

Este proyecto será co-financiado por el Laboratorio de Calidad de Leche, Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.



## VI. RESULTADOS

### Identificación microbiológica

Un total de 125 colonias con morfología característica de *S. aureus* ( $M^{(+)}$ ) fueron identificadas y aisladas desde 77 (72%) operaciones lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble (Tabla 5). De las 6 operaciones lecheras con más de un estanque, 5 resultaron negativas a la identificación de colonias  $M^{(+)}$ . La operación lechera positiva tenía 3 estanques en los que en cada muestra de leche se aisló 1 colonia  $M^{(+)}$ .

El tamaño que presentaron las colonias  $M^{+}$  presuntivas a *S. aureus* varió entre 1 a 2 mm a las 24 horas de cultivo aeróbico en ASE. Un 89,6% ( $n = 112$ ) de los aislados presentó un tamaño entre 1 a 1,5 mm. El patrón hemolítico de los aislados  $M^{+}$  identificados correspondió a un 44,0% ( $n=55$ ), 30,4% ( $n=38$ ) y 25,6% ( $n=32$ ) para  $\alpha$ - $\beta$ -hemólisis,  $\alpha$ -hemólisis y  $\beta$ -hemólisis, respectivamente. La prueba de catalasa resultó positiva en los 125 aislados  $M^{+}$  de *S. aureus* ( $M^{(+)Ct^{(+)}$ ) evaluados (Tabla 2). Los resultados de la prueba de coagulasa a las 24 horas de incubación identificó como positivos 98 (78,4%) aislados  $M^{(+)Ct^{(+)}$  de *S. aureus* ( $M^{(+)Ct^{(+)Cg^{(+)}$ ) (Tabla 2).

No se encontraron diferencias ( $p<0.05$ ) entre las proporciones de grupos de *S. aureus*  $M^{(+)Ct^{(+)Cg^{(+)}$  identificados en las provincias de Biobío y Ñuble. De la misma forma, no se encontraron diferencias ( $p<0.05$ ) entre las proporciones de *S. aureus*  $M^{(+)Ct^{(+)Cg^{(+)}$  de las provincias de Biobío y Ñuble en sus patrones hemolíticos ( $\alpha$ - $\beta$ -hemólisis,  $\alpha$ -hemólisis y  $\beta$ -hemólisis).

### Identificación molecular

Un total de 89 aislados  $M^{(+)Ct^{(+)Cg^{(+)}$  resultaron positivos a la identificación de *S. aureus* por PCR ( $M^{(+)Ct^{(+)Cg^{(+)PCR^{(+)}$ ) (Tabla 5; Figura 2). En una misma muestra de leche se identificaron 1, 2, 3 y hasta 4 aislados de *S. aureus* con diferencia en su morfología. De esta forma de los 89 aislados; 1, 2, 3 y 4 aislados se identificaron desde 45, 14, 4 y 1 muestras de leche de estanque, respectivamente. Es más; al evaluar los aislados de *S. aureus* morfológicamente dentro de una misma operación lechera se identificaron 1, 2, 3 y 4 aislados en 42, 14, 5 y 1. Esta

**Tabla 5.** Niveles de identificación de aislados de *Staphylococcus aureus* desde muestras de leche de estanque y operaciones lecheras de la provincia de Biobío y Ñuble.

Prueba	Granja lechera		Muestra leche de estanque		Aislados	
	+	-	+	-	+	-
M <sup>(+)</sup>	77 (72,0)	30 (28,0)	79 (68,7)	36 (31,3)	125 (N.A)	N.A.
M <sup>(+)</sup> Ct <sup>(+)</sup>	77 (72,0)	30 (28,0)	79 (68,7)	36 (31,3)	125(100)	0 (0)
M <sup>(+)</sup> Ct <sup>(+)</sup> Cg <sup>(+)</sup>	66 (61,7)	41 (38,3)	68 (59,1)	47 (40,9)	98 (78,4)	27 (21,6)
M <sup>(+)</sup> Ct <sup>(+)</sup> Cg <sup>(+)</sup> PCR <sup>(+)</sup>	62 (58,0)	45 (42,0)	64 (55,6)	51 (44,3)	89 (71,2)	36 (28,8)

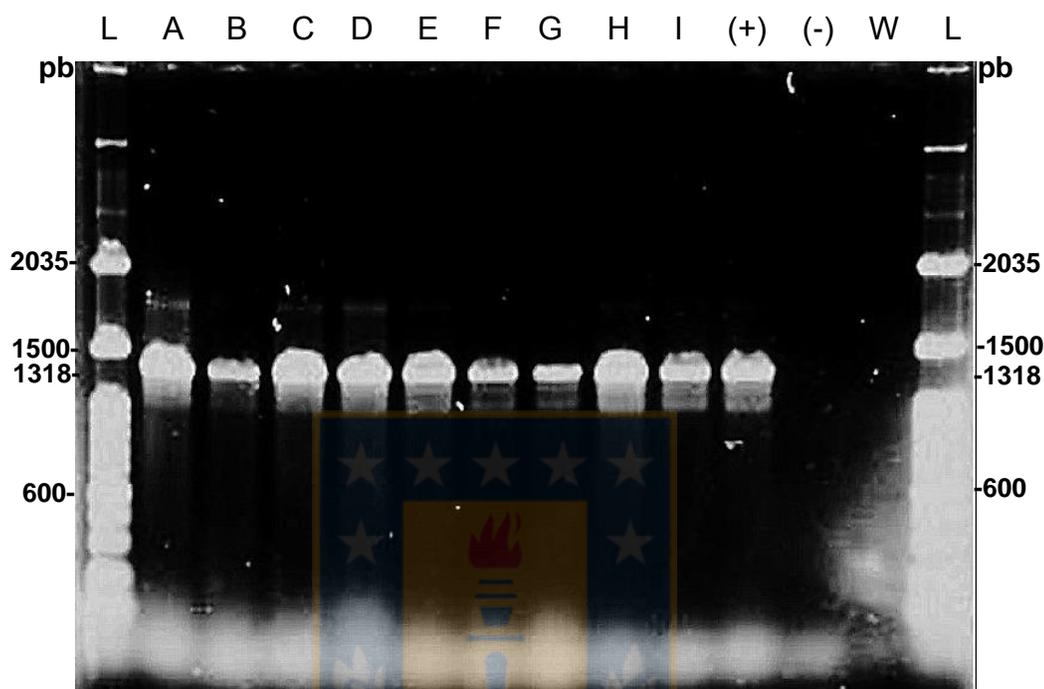
M<sup>(+)</sup>=Positivo en la identificación de aislados con morfología de colonia con tonalidad blanco amarillentas con presencia de α y/o β-hemólisis a su alrededor.

M<sup>(+)</sup>Ct<sup>(+)</sup>=MPC<sup>(+)</sup> positivos al test de catalasa (Bactident® catalasa, Merck).

M<sup>(+)</sup>Ct<sup>(+)</sup>Cg<sup>(+)</sup>=MPC<sup>(+)</sup>Ct<sup>(+)</sup> positivos al test de coagulasa (Bactident ® coagulasa, Merck).

M<sup>(+)</sup>Ct<sup>(+)</sup>Cg<sup>(+)</sup>PCR<sup>(+)</sup>=M<sup>(+)</sup>Ct<sup>(+)</sup>Cg<sup>(+)</sup> positivos a la prueba de reacción en polimerasa específico para *S. aureus*.

N.A.= No aplica por ser criterio de selección inicial; no existen negativos.



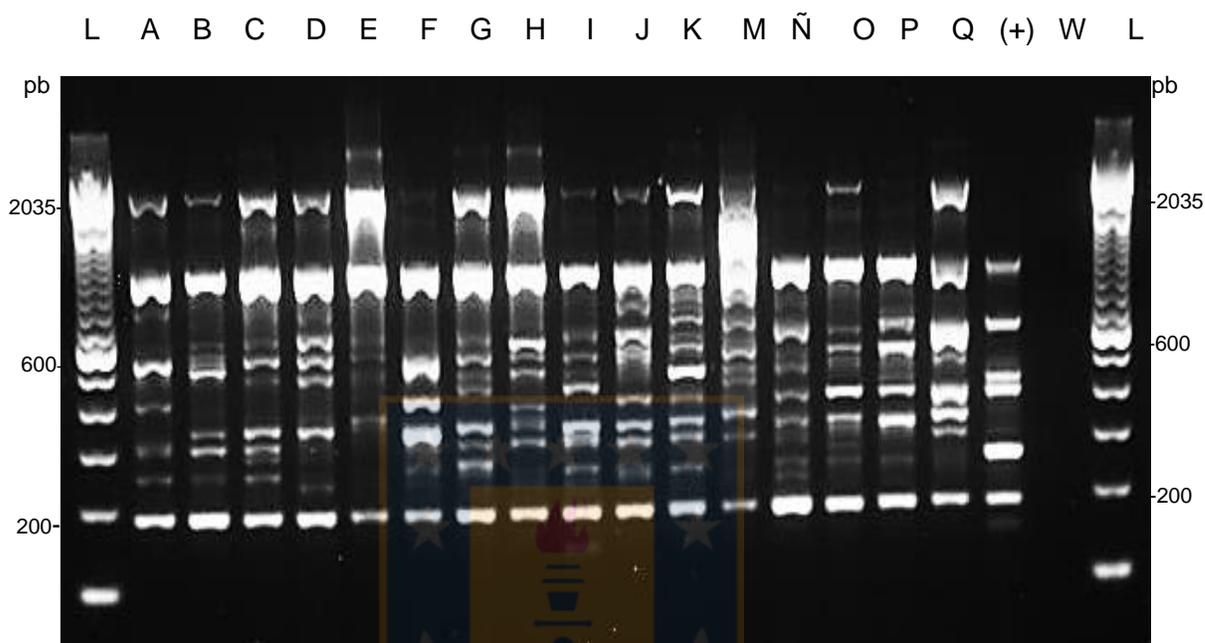
**Figura 2.** Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 1318 pares de bases (pb) específico para *S. aureus* utilizando primers Sau 327-1645. Gel de agarosa de 1,5%. Letras consecutivas de la A a la H = Corresponden a aislados 9 de los 89 aislados positivos a *S. aureus* con PCR que presentan morfología de colonia compatible, catalasa y coagulasa positiva. (+) = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (-) = *Streptococcus* sp.; W = Agua molecular libre de Dnasa/RNAasa. L = Marcador de peso molecular. pb = Pares de bases.

La tipificación de *S. aureus* por RAPD-PCR identificó preliminarmente 81 patrones de bandas de electroforéticos diferentes en los 89 aislados de *S. aureus* confirmados por PCR ( $M^{(+)}Ct^{(+)}Cg^{(+)}PCR^{(+)}$ ) (SID=0.99). Los 81 patrones de correspondieron a: 73 genotipos representados con un único aislado, 5 genotipos con 2 aislados y 2 genotipos con 3 aislados. Los 7 genotipos de *S. aureus* con más de un aislado sus patrones de banda de RAPD-PCR fueron comparados contiguamente en un gel de agarosa de 1,8% (Figura 3). Para este análisis se repitieron los procedimientos de extracción de ADN, RAPD-PCR y separación de bandas en gel de agarosa para cada aislado (Munoz and Zadoks, 2007). Al evaluar los nuevos patrones de bandas obtenidos por RAPD-PCR se identificó que cada asilado correspondía a una cepa genotípicamente diferente. De esta forma, se identificaron por 89 genotipos diferentes de *S. aureus* en la provincia de Biobío y Ñuble (SID=1). Todos los aislados de *S. aureus* identificados con morfología diferente dentro de una misma muestra u operación lechera fueron confirmados como genotípicamente diferentes por patrón de bandas obtenidos por PCR.

#### **Patrones de banda electroforéticos de RAPD-PCR para *S. aureus*.**

El número de bandas electroforéticas obtenidas en las 89 cepas de *S. aureus* identificadas por RAPD-PCR en vario entre 6 a 9 bandas. Un 94,4% (n=84) de los aislados presentaron en su patrón electroforético 2 fragmentos de 900 y 200 pares de bases (Figura 2). La variabilidad de patrones de bandas de cada cepa se identifica principalmente entre las bandas ubicadas entre los fragmentos de 200 y 900 pb.

No se observaron diferencias entre las provincias de Biobío y Ñuble para los aislados, muestras de leche de estanque y operaciones lecheras identificados como positivos para *S. aureus* ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Patrones de bandas de aislados de *S. aureus* obtenidos por amplificación aleatoria de ADN polimórfico identificados desde muestras de leche de granjas lecheras de la provincias de Biobío y Ñuble. A-Q: Letras consecutivas desde A a Q corresponden a 16 de los 89 aislados de *S. aureus* identificados desde leche de estanque; W= Agua molecular libre de Dnasa/RNAasa; L= Marcador de peso molecular; pb= Pares de bases.

## VII. DISCUSIÓN

*Staphylococcus aureus* es un patógeno intramamario contagioso aislado desde muestras de leche y rebaños lecheros de diferentes países del mundo (Joo *et al.*, 2001, Jayarao *et al.*, 2004, Capurro *et al.*, 2010). El cultivo microbiológico de la leche de estanque es utilizado para evaluar indirectamente patógenos IMI contagiosos presentes en el rebaño lechero (Jayarao *et al.*, 2004, Van Slykke *et al.*, 2008). La presente investigación permitió identificar *S. aureus* en aproximadamente 55% de las muestras de leche de estanque evaluadas en operaciones lecheras de las provincias del Biobío y Ñuble (n=62). De la misma forma, el total de los aislados de *S. aureus* identificados tanto entre como dentro de las operaciones lecheras correspondieron a cepas genotípicamente diferentes (SID=1). Esta variabilidad genética de *S. aureus* entre operaciones lecheras de las provincias del Biobío y Ñuble sugieren que estrategias control y prevención deben estar dirigidas al patrón epidemiológico de la o las cepas presentes en cada granja lechera. El presente estudio permite evaluar *S. aureus* en muestras de leche de estanque de operaciones lecheras que poseen cercano al 75% de las vacas lecheras de las provincias del Biobío y Ñuble (Instituto Nacional de Estadística, 2007).

En un mismo rebaño se ha identificado que cepas de *S. aureus* en leche de cuartos mamarios con IMI y leche estanque corresponden genotípicamente a una misma cepa de *S. aureus* (Fagundez *et al.*, 2007). Esto permite sugerir que cepas de *S. aureus* identificadas desde leche de estanque en las provincias de Biobío y Ñuble pueden corresponder a cepas causantes de IMI en cada rebaño. Fagundez *et al.* (2007) respalda él porque aislar microorganismos contagiosos tal como *S. aureus* desde leche de estanque, es utilizado como una aproximación de IMI causadas por este microorganismo en la operación lechera. La leche de IMI subclínicas causadas por *S. aureus* son normalmente ordeñadas y acopiadas en conjunto con el resto de la leche del rebaño en el estanque. La presencia de *S. aureus* en leche de estanque se asocia con recuentos celulares somáticos del rebaño  $\geq 200.000$  cel/mL (Jayarao *et al.*, 2004; Barkema *et al.*, 2006; Olde *et al.*, 2006). En una misma operación lechera una cepa o a una minoría de cepas

responsables de una alta prevalencia de IMI y coexisten con un número variable de cepas de *S. aureus* causantes de una baja prevalencia de IMI (Zadoks *et al.*, 2012). En las provincias del Biobío y Ñuble se identificó una cepa única de *S. aureus* en un 67,7% de las operaciones lecheras evaluadas. Nuestro estudio no permite realizar mayores conclusiones respecto al rol de estas cepas de *S. aureus* en muestras de leche de estanque en IMI. No obstante, en otros estudios se pueden contrastar las cepas aisladas desde leche con IMI.

El diagnóstico y subtipificación de *S. aureus* como causante de IMI desde muestras de leche con IMI es normalmente realizado para evaluar su reacción con otras cepas de *S. aureus* presentes en el rebaño (Zadoks *et al.*, 2002; Havery *et al.*, 2008). Un amplio número de estudios describen una amplia diversidad genética de cepas de *S. aureus* aisladas desde leche de cuartos o compuesta de animales que cursan una IMI (Enrigh *et al.*, 2000; Gurjar *et al.*, 2011). Dentro de un rebaño se ha identificado que existe un alto número de cepas de *S. aureus* no predominantes dentro de la granja lechera (Joo *et al.*, 2001; Gurjar *et al.*, 2012). Diversas fuentes de *S. aureus* extramamarias se han descrito de sitios extramamarios dentro de la operación lecheras (Zadoks *et al.*, 2002). Una de estas fuentes es la piel del pezón; *S. aureus* ha sido aislado desde la microbiota normal de la piel del pezón de animales sanos y con IMI. Si bien el rol de cepas de *S. aureus* presentes en la microbiota de la piel del pezón en una IMI aún no está claro, estas cepas podrían ser una transferidas a través de la máquina de ordeño a la leche de estanque (Havery *et al.*, 2008; Oikinomou *et al.*, 2012; Oikinomou *et al.*, 2014). Cepas heterogéneas de *S. aureus* identificadas dentro de las muestras de leche de estanque de las provincias del Biobío y Ñuble pueden provenir tanto de patógenos eliminados cuartos mamarios con IMI; como también a microorganismos establecidos en superficies que toman contacto con esta leche. Por otro lado, reportes preliminares han identificado en la provincia de Ñuble la presencia de superficies de la máquina de ordeño con comunidades de microorganismos por problemas en protocolos de sanitización (Latorre and Munoz, 2015). El presente estudio no permite identificar el origen de cada aislado ni su vinculación con una IMI. Sin embargo, realiza la primera aproximación de

identificación molecular y de diversidad de cepas de *S. aureus* presentes en leche de estanque de la provincia del Biobío y Ñuble.

En la zona sur de Chile se han descrito cepas homologas de *S. aureus* desde aislados de leche de IMI (Smith *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2013). Por una parte, Smith *et al.* (2005), vinculo estos aislados de las zona sur de Chile con aislados intra y extramamarios presentes en diferentes partes del mundo. Por otro lado, Valdés *et al.* (2013) reportó 20 aislados de *S. aureus* genotípicamente homólogos causantes de IMI de la zona sur de Chile por REP-PCR, RFLP-PFGE y ERIC-PCR. Sin embargo, falencias en la descripción de la metodología utilizada son observados. La producción de leche en la zona centro-sur y la zona sur de Chile difieren entre otras; en la intensidad de producción de leche anual, la disponibilidad de forraje, sistemas de alimentación, entre otros. Diferencias en manejo de la operación lechera, tal como el tipo de estabulación del rebaño, se describe que el impacta la prevalencia de *S. aureus* en leche de estanque (Olde *et al.*, 2010).

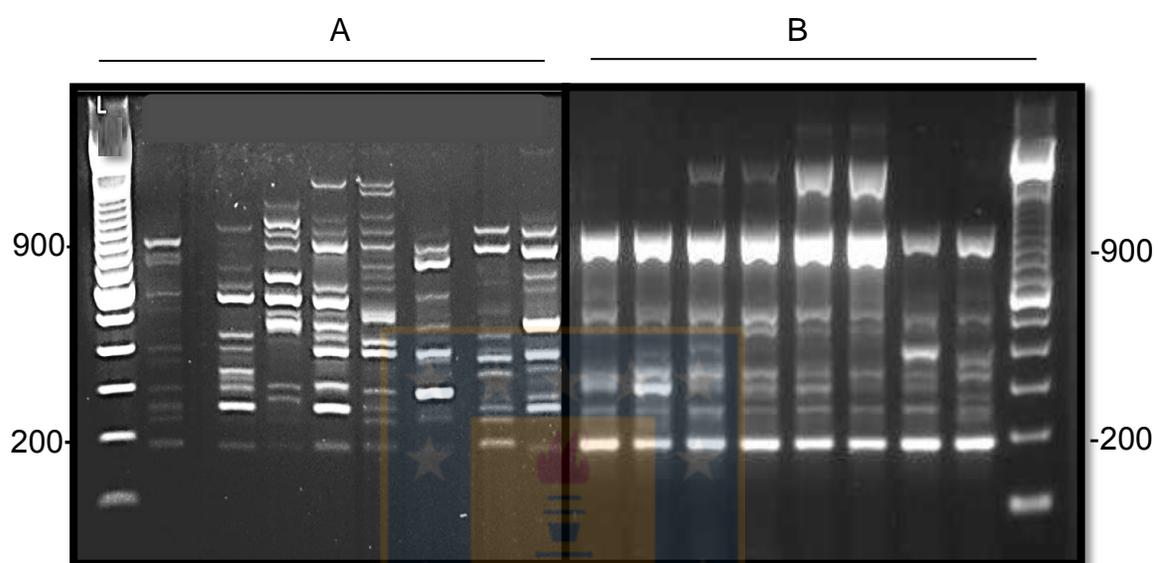
La capacidad de identificar y tipificar correctamente aislados de *S. aureus* en una misma cepa guarda relación directa con la metodología utilizada. Dependiendo de la investigación el diagnóstico de *S. aureus* desde muestras de leche es realizado utilizando los PME complementada con pruebas adicionales (Boerlin *et al.*, 2003; Oikonomou *et al.*, 2012). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado ser robusta en la identificación de patógenos intramamarios. El implementar el PCR a aislados M<sup>+</sup>Ct<sup>+</sup>Cg<sup>+</sup> permitió identificar 9 (9.1%) aislados catalasa positivo y morfología compatible con colonias de *S. aureus*. La existencia de especies de *Staphylococcus* coagulasa positivo tales como *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus hycus* han sido aislados desde leche son posible de identificar erróneamente como *S. aureus* al utilizar los criterios microbiológicos tradicionales (Oliver *et al.*, 2004; Capurro *et al.*, 2010). De esta forma 4 operaciones lecheras con un único aislado M<sup>+</sup>Ct<sup>+</sup>Cg<sup>+</sup> identificada como previamente positivas por MSP fueron re-clasificadas como negativas. Esto realza la importancia de complementar el diagnóstico de PME con una prueba robusta tal

como PCR (Riffon *et al.*, 2001; Kuzma *et al.*, 2003). Por otro lado, en la tipificación de aislados de *S. aureus* fueron clasificados en la presente investigación como 2 aislados iguales cuando el patrón de bandas sea indistinguible uno con respecto a otro. En este sentido y pese a que la técnica de RAPD-PCR es una técnica comparativa; se identificó que aislados identificados por Gurjar (2012) en los Estados Unidos presenta los mismos fragmentos de 200 y 900 pb identificados en un 90% de los aislados de *S. aureus* de nuestro estudio (Figura 4). No obstante, para RAPD-PCR no existen criterios de subtipificación de cepas de acuerdo al número de bandas en las que coinciden 2 aislados de *S. aureus* como los descritos para PFGE (Tenover *et al.*, 1995). La técnica de PFGE es utilizada como la técnica *gold standard* para la subtipificación de microorganismos con un mayor poder de discriminación respecto a RAPD-PCR (Saulnier *et al.*, 1993; Sabat *et al.*, 2006). La técnica de PFGE demora más que otras técnicas de tipificación y necesita de un pulsador de corriente. Un importante número de estudios de genotipos de *S. aureus* difiere en la metodología de identificación especie-específica de *S. aureus* en rebaños lecheros.

La identificación de una amplia variedad de cepas de *S. aureus* en muestras de leche de estanque de las provincias del Biobío y Ñuble permite conocer que no existe una cepa predominante de *S. aureus* entre leches de estanque de granjas lecheras de las provincias del Biobío y Ñuble. Para entender la epidemiología de cepas de *S. aureus* responsables de IMI de granjas lecheras de las provincias del Biobío y Ñuble mayor investigación es requerida. La identificación y caracterización de cepas de *S. aureus* presentes en cada granja lechera permitiría implementar estrategias de control de acuerdo al patrón epidemiológico de la o las cepas presentes en la granja lechera. En este sentido el identificar los factores de virulencia predominantes en las cepas de *S. aureus* causantes de una IMI son factores posibles de estudiar en la diversidad genética de aislados de la provincias de Biobío y Ñuble. Por otro lado, el consumo de leche de leche de cruda puede considerar un riesgo de transmisión de patógenos que causan enfermedades de transmisión alimentaria (Jørgensen *et al.*, 2005; Jayarao *et al.*, 2006). Reportes preliminares muestran que el consumo de leche cruda por personal de lecherías

de las provincias de Ñuble en operaciones lecheras es reportado (Latorre and Munoz, 2013). De esta forma, la caracterización de cepas de *S. aureus* con factores de impacto en la salud pública es otra punto importante a considerar (ej. toxinas o resistencia antibiótica). La variada diversidad genética de *S. aureus* nos sugieren que estrategias de control y prevención deben estar dirigidas al patrón epidemiológico de la o las cepas presentes de cada granja lechera de las provincias Biobío y Ñuble.





**Figura 4.** Comparación de patrones de bandas de aislados de *S. aureus* obtenidos del Estado de Nueva York; Estados Unidos (A) (Extraído de Gurjar *et. al*, 2012) y provincias del Biobío y Ñuble; Chile (B) utilizando RAPD-PCR con primer AUG3. Números consecutivos del 1 al 8 = Corresponden a aislados de *S. aureus*; L= Marcador molecular.

## VIII. CONCLUSIONES

1. *Staphylococcus aureus* fue identificado en un 55,6% de las muestras de leche de operaciones lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble.
2. El complementar los PME con PCR en el diagnóstico de *S. aureus* permitió identificar aislados, muestras de leche y operaciones lecheras falsos positivos.
3. No existe un tipo predominante de cepa de *S. aureus* entre leches de estanque de granjas lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble.
4. Un 67,7% de las muestras de leche de estanque presenta una única cepa de *S. aureus* por operación lechera.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adwan, K.. 2013. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia microbiológica*: 1-4.
- Almeida, R., K. Matthews, E. Cifrian, A. Guidry, and S. Oliver. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* 79(6): 1021-1026.
- Barbano, D., Y. Ma and M. Santos. 2006. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science* 89:15–19.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. 2006. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science* 89(6): 1877-1895.
- Barkema, H., M. Green, A. Bradley and R. Zadoks. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science* 92(10):4717-4729.
- Bautista-Trujillo, G., J. Solorio-Rivera, I. Rentería-Solórzano, S. Carranza-Germán, J. Bustos-Martínez, R. Arteaga-Garibay, V. Baizabal-Aguirre, M. Cajero-Juárez, A. Bravo-Patiño and J. Valdez-Alarcón. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology* 62(Pt 3):369-376.
- Blowey and Edmonson. 2010. *Mastitis Control in Dairy Herds*. (2<sup>nd</sup>ed.). CAB international. Wallingford, UK.
- Boerlin, P., P. Kuhnert, D. Hüsey, and M. Schaellibaum. 2003. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* 41(2): 767-771.
- Brakstad, O., J. Mæland and Y. Tveten. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection of genes for *Staphylococcus aureus* thermonuclease and methicillin resistance and correlation with oxacillin resistance. *Apmis*, 101(7-12):681-688.

- Capurro, A., A. Aspán, K. Artursson and K. P Waller. 2010. Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. *The Veterinary Journal* 185(2): 188-192.
- Cribier, B., G. Prevost, P. Couppe, V. Finck-Barbancon, E. Grosshans and Y. Piemont. 1992. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections?. *Dermatology* 185(3): 175-180.
- Cucarella, C., M. Tormo, C. Ubeda, M. Trotonda, M. Monzon, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa, and J. Penades. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 72(4): 2177–2185.
- Choi, Y. W., B. L. Kotzin, L. Herron, J. Callahan, P. Marrack, and J. Kappler. 1989. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin" superantigens" with human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(22): 8941-8945.
- Deurenberg, R., C. Vink, S. Kalenic, A. Friedrich, C. Bruggeman and E. Stobberingh. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 13(3): 222–235.
- Enright, M., N. Day, C. Davies, S. Peacock, and B. Spratt. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 38:1008-1015.
- Fagundes H, L Barchesi, AN Filho, LM Ferreira, CAF Oliveira. 2010. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal Microbiology* 41: 376-380.
- Fitzgerald, J., S. Monday, T. Foster, G. Bohach, P. Hartigan, W. Meaney and C. Smyth. 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *Journal of Bacteriology* 183(1):63-70.
- Fox, L., T. Besser and S. Jackson. 1996. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209(6):1143-1146.

- Fox L.K., R.N. Zadoks, C.T. Gaskins. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology* 107 (3): 295–299.
- Frost, A. J. 1975. Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. *Infection and immunity* 12(5), 1154-1156.
- Fuello, J. M. 2005. Frecuencia efectos de toxinas superantígenos de *Staphylococcus aureus*: de diferentes orígenes relaciones con tipos genéticos. Departamento de microbiología funcional. Universidad Oviedo. Fuello, España.
- Gagliano, V. and R. Hinsdill. 1970. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *Journal of Bacteriology* 104(1): 117-125.
- Garrity, G., M. Winters and D. Searles. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systemic bacteriology* (2<sup>nd</sup> ed.) <[http://mibi.unimuenster.de/imperia/md/content/biologie\\_immb/\\_v/download/fgmtaxonomiews10-11/bergey.pdf](http://mibi.unimuenster.de/imperia/md/content/biologie_immb/_v/download/fgmtaxonomiews10-11/bergey.pdf)>[Consulta: 07 marzo 2012].
- Guerrero, J. A. Memoria de Título. Sanidad de la glándula mamaria y su relación con el funcionamiento y diseño de los equipos de ordeño mecánico en algunas lecherías de la provincia de Ñuble. Universidad de Concepción. Fac. de Medicina Veterinaria.
- Gresham, H., J. Lowrance, T. Caver, B. Wilson, A. Cheung and F. Lindberg. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *The Journal of Immunology* 164(7):3713-3722.
- Gurjar A. Milk. 2011. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine using RAPD-PCR. 3<sup>rd</sup> International symposium on mastitis and Milk Quality. September 22-24, 2011. St. Louis, Missouri.
- Gurjar, A., G. Gioia, Y. Schukken, F. Welcome, R. Zadoks and P. Moroni. 2012. Molecular diagnostics applied to mastitis problems on dairy farms. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 28(3): 565-576.
- Hammel, M., G. Sfyroera, D. Ricklin, P. Magotti, J. Lambris and B. V Geisbrecht. 2007. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nature immunology* 8(4): 430-437.

- Harrison, I., M. Lavery and E. Sterling. 2001. Genetic diversity. Connexions module: m12158. < <http://cnx.org/content/m12158/latest> >. [Consulta: 04 marzo 2013].
- Hartwell, L., L. M. Hood, Goldberg, A. E. Reynolds, L. Silver and R. Veres. 2000. Genetics: from genes to genomes. McGraw-Hill. Boston, USA.
- Haveri, M., M. Hovinen, A. Roslöf and S. Pyörälä. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. Journal of clinical microbiology 46(11): 3728-3735.
- Hébert, A., K. Sayasith, S. Sénéchal, P. Dubreuil, J. Lagacé. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS microbiology letters 193(1): 57-62.
- Hibbitt, K., C. Cole and B. Reiter. 1969. Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. Journal of general microbiology 56(3):365-371.
- Hirtch, D. and E. Biberstein, 2004. *Staphylococcus*. pp: 153-158. In: Hirsh, D., MacLanchlan N. and Walker R. (Eds.). Veterinary microbiology (2nd. ed.). Blacwell publishing Asia. Oxford, United Kingdom.
- Hogan, J., R. Gonzalez, R. Harmon, S. Nickerson, S., J. Pankey and K. Smith. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI.
- Holden, M., E. Feil, J. Lindsay, S. Peacock, N. Day M. Enright, T. Foster, C. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. Barrell, B. Spratt and J. Parkhill. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence

- and drug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(26): 9786-9791.
- Hunter, P. R. and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. Journal of clinical microbiology 26(11): 2465-2466.
- Hynes, W. L., and S. L. Walton. 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. FEMS microbiology letters 183(2): 201-207.
- Instituto de Nacional de Estadística. 2007. Lecherías Estudio Zona Sur 2006. Santiago, Chile.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria. 2007. Sector agropecuario de VIII región del Biobío. Centro Regional de Investigación Quilamapu. Chillán, Chile.
- Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougél, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville and G. Lina. 2001. EGC, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. The Journal of Immunology 166(1): 669-677.
- Jayarao, B., S. Pillai, A. Sawant, D. Wolfgang, N. Hegde. 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. Journal of dairy science-champaign Illinois 87: 3561–3573.
- Jayarao, B, S Donaldson, B. Straley, Sawant, N Hegde and J. Brown. 2006. A survey of foodborne pathogen in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. Journal of dairy science association 89: 2451-2558.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins and A. Tarkowski. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. The Journal of Immunology, 172(2):1169-1176.
- Joo, Y., L. K. Fox, W. C. Davis, G. A. Bohach and Y.H. Park. 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. Veterinary Microbiology 80: 131-138.

- Jorgensen, H., T. Mork, H. Hogasen and L. Rovik. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal Applied Microbiology* 99: 158-166.
- Kampen, A., T. Tollersrud and A. Lund. 2005. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro. *Infection and immunity* 73(3):1578-1583.
- Kitchen, B. J. 1981. Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research* 48(01):167-188.
- Kuźma, K., E. Malinowski, H. Lassa, A. Kłossowska. 2003. Specific detection of *Staphylococcus aureus* by PCR in intramammary infection. *Bull Vet Inst Pulawy* 47:183-190.
- Latorre, A., J. Van Kessel, J. Karns, M. Zurakowski, A. Pradhan, K. Boor, J. Jayarao, B. Houser, C. Daugherty and Y. Schukken. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of dairy science* 93(6): 2792-2802.
- Latorre, A. and M. Muñoz. 2013. Assessment of on-farm raw milk consumption in Chilean dairy operations. National Mastitis Council Annual meeting Proceedings. San Diego, California, United States. Pp: 161-162.
- Latorre, A. and M. Muñoz. 2015. On-farm evaluation of surfaces in contact with milk during milking as a factor affecting the microbiological quality of bulk tank milk in Chilean dairy farms: A preliminary report. National Mastitis Council Annual meeting Proceedings. Memphis, Tennessee, United States. Pp: 231-232.
- Larsen, H., F. Aarestrup, and N. Jensen. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and  $\beta$ -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Veterinary Microbiology* 85(1): 61-67.
- Lobos, P. 2011. Análisis retrospectivo de los reportes de porcentajes de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociada a mastitis bovina en la región del Biobío. Tesis de pregrado. Universidad de Concepción. Chile.

- Louie, L., J. Goodfellow, P. Mathieu, A. Glatt, M. Louie and A. Simor. 2002. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 40(8): 2786-2790.
- Madigan, M., J. Martinko and M. J. Parker, 2000. *Brock Biology of Microorganisms* (9th. ed.). Prentice Hall. New Jersey. USA.
- Malachowa, N., A. Sabat, M. Gniadkowski, J. Krzyszton-Russjan, J. Empel, J. Miedzobrodzki, K. Kosowska-Shick, P. Appelbaum and W. Hryniewicz. 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of clinical microbiology* 43(7): 3095-3100.
- Maroney, M. 2005. Milk Money Fact Sheet 01: *Staphylococcus aureus*. Resources Milk Money. <<http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/staphylococcus-aureus.pdf>>. [Consulta: 04 septiembre 2012].
- Munoz, M. and R. Zadoks. 2007. Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90(3): 1220–1224.
- Munoz, M., F. Welcome, Y. Schukken, and R. N. Zadoks. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *Journal of Clinical Microbiology* 45(12): 3964-3971.
- Munoz, M. A. 2011. Milk Quality and mastitis data from Chile. *Mastitis and milk quality: a worldwide challenge*. *M<sup>2</sup>-Magazin* vol 1:14.
- Oikonomou, G., V. Machado, C. Santisteban, Y. Schukken and R. Bicalho. 2012. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS one* 7(10) e47671. 26.
- Oikonomou, G., Bicalho, M. L., Meira, E., Rossi, R. E., Foditsch, C., Machado, V. S., A, Vieira, C. Santiesteba, Y. Schukken and Bicalho, R. C. 2014. Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. *PLoS one* 9(1): e85904.

- Olde, R, H. Barkema, S. Veenstra, D. Poole, R. Dingwell and G. Keefe. Prevalence of contagious pathogens in bulk tank milk un Prince Edward Island. *Canadian Veterinary Journal*: 567-572.
- Olde, R., H. Barkema, D. Scholl, D. Poole and D. Kelton. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 97(1): 20-28.
- Oliver, S., R. González, J. Hogan, B. Jayarao and W. Owens. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4<sup>th</sup>Ed. National Mastitis Council, Verona WI, United States. Pp: 1-12.
- Oliver, S., B.Jayarao and R. Almeida. 2005. Review: Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment. Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease* 2(2): 111-129.
- Phonimdaeng, P., M. O'reilly, P. Nowlan, A. Bramley and T. Foster. 1990. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology* 4(3): 393-404.
- Riffon, R., K. Sayasith, H .Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, and J. Lagacé. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of clinical microbiology* 39(7): 2584-2589.
- Rollof, J., J. Braconier, C. Söderström and P. Nilsson-Ehle. 1988. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 7(4):505-510.
- Sabat, A., N. Malachowa, J. Miedzobrodzki and W. Hryniewicz. 2006. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of clinical microbiology* 44(10), 3804-3807.
- Sanger institue. 2012.<<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/staphylococcus-aureus.html>>. [Consulta: 07 marzo 2012].
- Saulnier, P., C. Bourneix, G. Prevost and A. Andremont. 1993. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel

- electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 31(4):982-985.
- Schleifer, K. and J. Bell. 2001. Family VIII. Staphylococcaceae pp.:392-421. D. Boone, G. Garrity, R. Castenholz, D. Brenner, N. Krieg and J. Staley. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. Volumen 3 de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2<sup>nd</sup>ed.)*. Springer. New York. USA.
- Sears, P. M., B. Smith, P.English, P.Herer, and N. Gonzalez. 1990. Shedding Pattern of *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science* 73(10):2785-2789.
- Singh, R., P. Ray, A. Das and M. Sharma. 2009. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of Medical Microbiology* 58 (8):1067-1073.
- Smith, E. M., L. E. Green, G. F. Medley, H. E. Bird, L. K. Fox, Y. H. Schukken, J. V. Kruze, A. J. Bradley, R. N. Zadoks, and C. G. Dowson. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43(9): 4737–4743.
- Smyth, D., E. Feil, W. Meaney, P. Hartigan, T. Tollersrud, J. Fitzgerald, M. Enrigh and C. Smyth. 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 58 (10): 1343-1353.
- Sordillo, L. M. and S. C. Nickerson. 1988. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *Journal of dairy science* 72(1): 228-240.
- Sutra, L. and B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 40(2):79-89.
- Tufano, M., R. Ianniello, M. Galdiero and F. Galdiero. 1990. Protein A and other surface components of *Staphylococcus aureus* stimulate production of IL-1

- alpha, IL-4, IL-6, TNF and IFN-gamma. *European cytokine network* 2(5):361-366.
- Valdes, I., M. Zamudio, C. Troncoso, R. Seguel y H. Oliva. 2013. Identificación y caracterización molecular de *Staphylococcus aureus*, aislados de lecherías del sur de Chile. Congreso Chileno de Buiatría. 21,22 y 23 de noviembre. Hotel Sonesta, Osorno, Chile.
- Vancraeynest, D., K. Hermans and F. Haesebrouck. 2004. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Veterinary Microbiology* 103(3):241-247.
- Van Slykke, T, F Nunes-Braga, D Nydam, R Zadoks, J Huntley, Y Schukken. 2008. Bulk tank surveillance program from New York Dairies. NMC 47<sup>th</sup> Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, USA. Pp: 200-201.
- Weidenmaier, C., J. Kokai-Kun, S. Kristian, T. Chanturiya, H. Kalbacher, M. Gross, and A. Peschel. 2004. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature medicine* 10(3): 243-245.
- Wilkinson, B., P. Peterson and P. Quie. 1979. Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the *Staphylococcus aureus* capsule: model for the antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers. *Infection and Immunity* 23(2): 502-508.
- Yoshizawa, Y., J. Sakurada, S. Sakurai, K. Machida, I. Kondo and S. Masuda. 2000. An Exfoliative toxin a-converting phage isolated from *Staphylococcus aureus* strain. *Microbiology and Immunology* 44(3), 189-191.
- Zadoks, R., W. Van Leeuwen, D. Kreft, L. Fox, H. Barkema, Y. Schukken, and A. Van Belkum. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal of clinical microbiology* 40(11):3894-3902.
- Zadoks, R. and Y. Schukken. 2006. Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. *Vet Clin Food Anim* 22(1): 229–261.

- Zadoks, R., J.Middleton, S. McDougall, J. Katholm and Y. Schukken. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 16(4): 357–372.
- Zhang, S., J. landolo and & G. Stewart.1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters* 168(2), 227-233.
- Zemelman, R. and L. Longeri. 1965. Characterization of staphylococci isolated from raw milk. *Applied microbiology* 13 (2): 167-170.

