



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, EVALUACIÓN DE FACTORES DE  
VIRULENCIA Y HABILIDAD DE ADHERENCIA DE *Staphylococcus aureus*  
AISLADOS DESDE LECHE DE ESTANQUE Y SUPERFICIES DEL EQUIPO  
DE ORDEÑO EN OPERACIONES LECHERAS.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

**PAULINA ANDREA PACHA BECERRA  
CHIILLAN-CHILE  
2020**

Profesor Guía: Alejandra Latorre Soto  
Dpto. de Patología y Medicina de Preventiva  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Universidad de Concepción

Profesor Guía

---

Dra. Alejandra Latorre Soto  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

---

Dr. Marcos Muñoz Domon  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Raúl Almeida  
Department of Animal Science  
University of Tennessee | UTK

---

Dr. Francisco Nualart Santander  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Fidel Ovidio Castro  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Daniel Gonzalez Acuña  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, que en su infinita forma de amor y ordenar la vida me ha llenado de bendiciones en este camino profesional y de vida. Quiero agradecer a mis padres, Atilio y Susana, por haber confiado y apoyado mis estudios aquel año 2005 cuando partí de Arica con destino a Chillán a estudiar Medicina Veterinaria. Les agradezco el darme un núcleo familiar de amor, respeto y enseñarme que los logros en la vida son producto de un esfuerzo constante. Los amo infinitamente y desde mi perspectiva de madre los admiro cada día que pasa. A mis hermanos, Susana, Rodrigo y Gabriela y sus familias por apoyarme siempre y sin condiciones pese a la distancia que nos separa. A Angelita, mi hija por ser una sonrisa que iluminó mi camino y me impide rendirme. A Humberto Alexander Monzón y nuestra pequeña familia peluda, gracias por ser mi compañero de vida, mi familia, apoyo en todo momento y por tu gran paciencia. A Andrés Rodríguez, por ser un excelente padre y amigo; y a su familia por la ti Berta y tío Manuel, la Señora Alicia Benítez, Don Raúl y familia por ser parte fundamental en el camino a esta instancia.

Con un cariño muy especial quiero agradecer a mis Profesores Guía y Co-guía, la Dra. Alejandra Latorre y el Dr. Marcos Muñoz, por guiarme en lo académico, pero sobre todo por su calidad humana, cariño, confianza y el apoyo brindado siempre que lo necesite. Ha sido un largo camino, en el que sin duda han sido se convirtieron en pilares fundamentales. Quiero agradecer a Pepita y a Javy por el cariño durante el trabajo fuera de horario que invadía los tiempos de familia. Agradezco al Dr. Raúl Almeida, su señora Eugenia Almeida, a mi querida amiga Juliana Terra y su hija Mía, por hacer un núcleo de apoyo en mi estadía en la Universidad de Tennessee.

Agradezco a mis amigos Alejandra Velázquez, Constanza Gutiérrez, Caro Silva, Diana Echeverri, Karina Bustos, Claudio Zuñiga, Felipe Peña Parceró, por forjar un camino más dulce de caminar. A mi querida Ceci por siempre tener una sonrisa en su rostro lo que sin duda ayudo aquellos largos días de trabajo. A mis colegas y amigas de la Universidad Santo Tomás Temuco, Nancy Ruiz y Francisca Fonseca, por ser un gran apoyo cuando en horas interminable de trabajo y todo se hacía más difícil; me apoyaron y alentaron a no rendirme.

Agradezco a CONICYT por financiar mis estudios doctorales a través de la beca Doctorado Nacional y los fondos destinados al el desarrollo de la presente tesis. Agradezco al equipo de Escuela de Postgrado y programa de Doctorado, por las gestiones y apoyo durante este largo camino, es especial al director de Programa Dr. Fidel Castro y secretaria “Clarita” Castro.

Agradezco al Dr. Francisco Nualart y al equipo del Centro Microscopía Avanzada, UdeC; por su ayuda en el procesamiento de muestras contemplado de manera inicial en la tesis doctoral. Agradezco el apoyo a los Laboratorio de la Universidad de Concepción y personal por permitirme realizar parte del desarrollo de mi tesis doctoral en sus laboratorios. A Freddy García y Dra. Juana López del Laboratorios de Medicina Veterinaria de Microbiología; a Daniel Sandoval, Daniela Rojas, Mónica Recabarren del laboratorio de Fisiología, al Dr. Fidel Castro y Dra. Lleretny Rodríguez de Laboratorio de Biología Molecular. Al Dr. Gerardo González, Dra. Helia Bello, Dr. Andres Opazo, Alejandro Aguayo, Mario Quezada, Iván San Martín del Laboratorio de Investigación en Agentes Antimicrobianos (LIAA) de la Facultad de Ciencias Biológicas. Agradezco a Esteban Paredes del Instituto de Salud Pública, por la gestión de cepas control de S.

*aureus* utilizados en el análisis de Factores de virulencia. Al Dr. Mark Holmes and Dr. Ibrahim Ba, del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge por su amable disposición y acceso a controles positivos de *mecC*.



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, EVALUACIÓN DE FACTORES DE  
VIRULENCIA Y HABILIDAD DE ADHERENCIA DE *Staphylococcus aureus*  
AISLADOS DESDE LECHE DE ESTANQUE Y SUPERFICIES DEL EQUIPO DE  
ORDEÑO EN OPERACIONES LECHERAS.**



La presente investigación fue financiada por:

BECAS CONICYT, FOLIO BECA 2101418.

PROYECTO FONDECYT DE INICIACIÓN 11130343.

## TABLA DE CONTENIDO

	LISTADO DE FIGURAS		ix
	LISTADO DE TABLAS		x
	RESUMEN		xi
	SUMMARY		xiii
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Antecedentes Generales</b>		
	Introducción	1	
	Referencias Bibliográficas	9	
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Caracterización Molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> Aislados De Leche De Estanque y Adherencias en Equipo De Ordeño</b>		
	Introducción	14	
	Hipótesis	21	
	Objetivo General y Específicos	22	
	Materiales y método	23	
	Resultados	29	
	Discusión	37	
	Conclusiones	46	
	Referencias Bibliográficas	47	
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>Identificación Genotípica De Factores De Virulencia Presentes En Aislados De <i>S. aureus</i> de operaciones lecheras de la región de Ñuble</b>		
	Introducción	58	
	Hipótesis	67	
	Objetivo General y Específicos	68	
	Materiales y método	69	
	Resultados	73	
	Discusión	80	
	Conclusiones	85	
	Referencias Bibliográficas	86	
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>Evaluación De La Habilidad De Adhesión De Cepas De <i>S. aureus</i> En Ensayo De Adherencia En Microplacas.</b>		
	Introducción	97	
	Objetivo General	98	
	Hipótesis	103	
	Objetivo General y Específicos	104	
	Materiales y método	105	
	Resultados	110	
	Discusión	114	
	Conclusión	119	
	Referencias Bibliográficas	120	

<b>CAPITULO 5</b>	<b>Discusión General</b>	127
	Conclusiones Generales	135
	Referencias Bibliográficas	136
<b>CAPITULO 6</b>	<b>Anexos</b>	
	Anexo 1. Listado de aislados analizados en investigación.	142
	Anexo 2. Dendogramas por lecherías.	149
	Anexo 3. Figura dendograma Latorre <i>et al.</i> , 2020.	155
	Anexo 4. Figura microscopia AMES, Latorre <i>et al.</i> , 2020.	156
	Anexo 5. Listado de abreviaciones	157
	Anexo 6. Copyright Release Journal of Dairy Science (capítulo 3).	158



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Esquema de trabajo para la caracterización molecular, evaluación de factores de virulencia y habilidad formadora de biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados desde leche de estanque y superficies del equipo de ordeña en lecherías de la región de Ñuble, Chile.	8
<b>Figura 2.1</b>	Esquema de identificación fenotípica de <i>S. aureus</i> basada en métodos bacteriológicos tradicionalmente utilizados en el diagnóstico de especies de <i>Staphylococcus</i> .	16
<b>Figura 2.2</b>	Dendograma de pulsotipos de <i>S. aureus</i> identificados desde muestras de leche y superficies con adherencia macroscópicas de la región de Ñuble.	31
<b>Figura 2.3.</b>	Mapa referencial de distribución de pulsotipos de <i>S. aureus</i> identificados en más de una lechería y comuna de la región de Ñuble.	32
<b>Figura 2.4</b>	Patrón de pulsotipos de <i>S. aureus</i> identificados en 3 muestras de leche de estanque consecutivas en 23 de lecherías de la región de Ñuble.	34
<b>Figura 3.1</b>	Dendograma de pulsotipos y perfil de virulencia de identificados en lechería 11 de la región de Ñuble.	77
<b>Figura 4.1</b>	Observación macroscópica (A) y microscópica (B) (TO-PRO®-3; tinción de ADN; C: microscopía electrónica de barrido) características de una biopelícula presente en superficie de equipo de ordeño de la región de Ñuble (Figura extraída de Latorre and Muñoz, 2015).	99
<b>Anexo 2</b>	Dendograma de aislados de <i>S. aureus</i> agrupados por granja lechera (1 a la 30).	149
<b>Anexo 3</b>	Figura dendograma de pulsotipos Latorre <i>et. al</i> , 2020.	155
<b>Anexo 4</b>	Figura microscopía electrónica AMES, Latorre <i>et. al</i> , 2020.	156
<b>Anexo 6</b>	Copyright Release Journal of Dairy Science (capítulo 3).	158

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b>	Pulsotipos de <i>Staphylococcus aureus</i> identificados desde leche de estanque y adherencias macroscópicas en superficie de equipo de ordeño en lecherías de la región de Ñuble, Chile y su Índice de Diversidad de Simpson.	33
<b>Tabla 2.2.</b>	Lecherías con distribución clonal de pulsotipos de <i>Staphylococcus aureus</i> entre adherencias macroscópicas en superficies en contacto con leche y leche de estanque de Chile.	36
<b>Tabla 3.1.</b>	Factores de virulencia de importancia en la patogénesis de <i>S. aureus</i> en IMI y oligonucleótidos a utilizar en la caracterización de cepas aisladas de operaciones lecheras de la región de Ñuble.	71
<b>Tabla 3.2.</b>	Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> de importancia en salud pública y oligonucleótidos a utilizar en la caracterización de cepas aisladas desde operaciones lecheras de la región de Ñuble.	72
<b>Tabla 3.3.</b>	Aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> positivos a factores de virulencia de importancia en adhesión a superficie y salud pública.	74
<b>Tabla 3.4.</b>	Perfil de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados desde leche de estanque y adherencias macroscópicas en el equipo de ordeño.	75
<b>Tabla 3.5.</b>	Perfiles de Virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados desde leche de estanque y adherencias macroscópicas del equipo de ordeño en lecherías de la región de Ñuble.	76
<b>Tabla 3.6.</b>	Pulsotipos de <i>S. aureus</i> con más de un perfil de virulencia identificados desde muestras de leche de estanque y adherencias macroscópicas del equipo de ordeño en lecherías de la región de Ñuble.	79
<b>Tabla 4.1.</b>	Cepas de <i>S. aureus</i> seleccionados para el ensayo de adherencia en microplacas de poliestireno identificadas desde leche de estanque y adherencias macroscópicas en superficie de equipo de ordeño.	106
<b>Tabla 4.2.</b>	Habilidad de adherencia de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes en leche de estanque y adherencias macroscópicas de superficies en contacto con leche y cepas identificadas sólo en LE.	111
<b>Tabla 4.3.</b>	Habilidad de adherencia de cepas de <i>S. aureus</i> de leche de estanque (LE) y adherencias macroscópicas en superficie de equipo de ordeño (AMES) identificados en lecherías de la Región de Ñuble.	112
<b>Anexo 1</b>	Listado detallado de origen de aislados de <i>S. aureus</i> y su clasificación acorde a su pulsotipo principal, pulsotipo y perfil de virulencia.	142
<b>Anexo 5</b>	Listado de abreviaciones	157

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la diversidad de cepas, factores de virulencia y habilidades de adherencia de *S. aureus* identificados desde leche de estanque (**BTM**) y adherencias macroscópicas en superficies de equipo de ordeño en contacto con leche durante el ordeño o enfriamiento de la leche (**AMES**). Un total de 30 lecherías de la Región de Ñuble fueron incluidas en este estudio. Por rebaño, 3 muestras consecutivas de BTM se recolectaron, correspondientes a una ordeña, y se realizó una inspección del equipo de ordeño en busca de AMES para la detección de *S. aureus*. Los aislados de *S. aureus* se subtipificaron por patrones de bandas obtenidos por enzima de macrorestricción *SmaI* y gel de electroforesis de campo pulsado (**PFGE**), y además se caracterizaron los patrones de virulencia (**PV**) y habilidad de adherencia *in vitro* en superficie de poliestireno. Para la caracterización del perfil de virulencia, genes de importancia en IMI (*nuc*, *coa*, *fnbA* e *icaA* e *icaD*) y de importancia en salud pública (resistencia a meticilina, genes *mecA* y *mecC*, y genes de enterotoxinas *sea* y *seb*) fueron incluidos. En cepas de *S. aureus* frecuentemente identificados entre lecherías y muestras se evalúa la habilidad de adherencia en microplacas de poliestireno (**MPA**). Un total de 226 aislados de *S. aureus* fueron identificados en 23 lecherías y 166 seleccionados para la evaluación de subtipificación por PFGE. Se observó un total de 42 pulsotipos; de los cuales 23 corresponden a pulsotipos principales (A-W) y 19 subtipos. Entre lecherías de la región se identificó una alta heterogeneidad de cepas de *S. aureus* (diversidad según índice de Simpson [**SID**] = 0,99). De los 42 pulsotipos identificados entre las lecherías, 8 de ellos (A, A.1, B.1, D, E, J, K, N, Q) fueron identificados en lecherías diferentes. Estos pulsotipos distribuidos entre lecherías podrían indicar factores asociados que permiten el movimiento de microorganismos entre lecherías

geográficamente distanciadas. Dentro de las lecherías, la diversidad de *S. aureus* fue variable (valores SID de 0 a 1). En 7 lecherías positivas a *S. aureus* en AMES y BTM, se identificó clonalidad entre pulsotipos de *S. aureus* de AMES y BTM. Esto podría sugerir que las adherencias presentes en las superficies de ordeño pueden tener un rol importante como potencial fuente de éste microorganismo en BTM. Al realizar la evaluación de los PV de los 166 aislados de *S. aureus*, se identificaron 5 perfiles de virulencia, donde el perfil *nuc* (+) *coa* (+) *fnbA* (+) *icaA* (+) *icaD* (+) *mecA* (-) *mecC* (-) *sea* (-) *seb* (-) fue el más frecuentemente observado, detectándose en 21 de los 23 pulsotipos principales y en 21 de las 23 lecherías *S. aureus* <sup>(+)</sup>. No se encontraron diferencias estadísticamente significativa entre los perfiles de virulencia de los aislados de *S. aureus* de BTM y AMES. Los perfiles de virulencia observados con mayor frecuencia incluyeron genes involucrados en la adherencia y la capacidad de formación de biopelículas de *S. aureus*, lo que podría representar una ventaja potencial para la bacteria durante las primeras etapas de la IMI y para la persistencia en las superficies. Para la evaluación de adherencia se seleccionaron 24 cepas de *S. aureus* frecuentemente identificados desde 19 lecherías de la región de Ñuble, identificando 6(25%), 14(58.3%), y 4(16.6%) cepas con alta, mediana y baja adherencia, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la habilidad de adherencia de poliestireno de cepas identificadas desde BTM-AMES y sólo de BTM. La presente investigación señala que cepas de *S. aureus* presentes en BTM y AMES podrían tener una dinámica diferente dentro de los rebaños lecheros. Resaltando la importancia de comprender la epidemiología de *S. aureus* leche de estanque y en superficies en contacto con leche con el fin de identificar estrategias a considerar en el control de este patógeno intramamario y potencial patógeno humano.

**Palabras claves:** Diversidad genética, virulencia, adherencia.

## SUMMARY

*Staphylococcus aureus* causes intramammary infections between and within dairy herds worldwide, including Chile. Since the mid-1990s, several studies have focused on investigate the epidemiology and, pathogenesis of this microorganism, however to the date it is still a difficult to eradicate dairy as a causative agent of intramammary infections. The objective of the present investigation was to assess strains diversity, virulence factors and adhesion hability of *S. aureus* identified from bulk tank milk (**BTM**) and macroscopic adhesions on milking equipment surfaces and in contact with milk during the milking or milk cooling (**AMES**). A total of 30 dairy farms were sampled from the Ñuble Region, Chile. In each herd, 3 consecutive BTM samples were collected, each correspond to one milking, and a unique inspection of macroscopic adherences on milking equipment were conducted *S. aureus* identification. For each sample, up to 3 isolates were randomly selected and subtyped by band patterns obtained by SmaI macro-restriction enzyme and pulsed field electrophoresis gel (**PFGE**), additionally characterized for their virulence patterns (**PV**) and adherence hability were assessed based on the presence of genes involved on the pathogenesis of intramammary infections (**IMI**) (*nuc*, *coa*, *fnbA*, *icaA*, *icaD*) and of public health concern (antimicrobial resistance genes *mecA* and *mecC*, and enterotoxin genes *sea* and *seb*). Ability to adhere on polystyrene microplates surfaces (MPA) was assess for strains with clonal distribution of pulsotypes between AMES and BTM. A total of 166 isolates were selected for subtyping evaluation identifying 42 total pulsotypes; and 23 main *S. aureus* (A-W) pulsotypes, which would indicate a high heterogeneity of *S. aureus* strains between dairy herds (Simpson's index diversity [SID] = 0.99). Among dairy herds, 8 pulsotypes were identified in different dairies (A, A.1, B.1, D, E, J, K, N, and Q). These pulsotypes could

indicate sources of distribution that allow the movement of these microorganisms from geographically separated dairies. Within dairies, *Staphylococcus aureus* strain diversity was variable (SID values from 0 to 1), and the same *S. aureus* pulsotype was identified from AMES and BTM samples on 7 dairies. This suggests that aggregates of *S. aureus* adhered to milking equipment surfaces may represent a potential source of this microorganism for BTM. When evaluating the PV of the *S. aureus* isolates, 5 virulence profiles were identified, where the *nuc* (+) *coa* (+) *fnbA* (+) *icaA* (+) *icaD* (+) *mecA* (-) *mecC* (-) *sea* (-) *seb* (-) profile was the most frequently observed in 21 of the 23 main pulsotypes detected and in 21 of 23 dairy farms. No differences were found between the virulence frequency profiles of the *S. aureus* isolates of BTM and adherence on the milking equipment surfaces. The most frequently observed virulence profile, included genes involved in the adhesion and biofilm formation, which could represent a potential advantage for this pathogen during the early stages of the IMI and persistence in milking equipment surfaces. Adherence ability was assessed for 24 *S. aureus* strains identifying 6 (25%), 14 (58.3%), and 4 (16.6%) pulsotypes with high, medium and low adherence ability, respectively. No significant differences were found in the polystyrene adhesion ability of strains identified from BTM-AMES and BTM. Results from this research suggest that *S. aureus* strains from BTM and AMES have different dynamics within dairy herds. Our study indicates that *S. aureus* strains present in BTM and AMES have different dynamics within different dairy herds. These results highlight the importance of understanding epidemiology of *S. aureus* on AMES and BTM as well as strategies to consider in the control of this intramammary pathogen and potential human pathogen.

**Keywords:** Genetic diversity, virulence, adherence.

## CAPITULO 1

### ANTECEDENTES GENERALES

#### INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que afecta rebaños lecheros de diferentes países del mundo al causar infecciones intramamarias (IMI), usualmente crónicas y subclínicas (Joo *et. al* 2001; Jayarao *et al.*, 2004; Capurro *et al.*, 2010). Las IMI subclínicas causan pérdidas productivas en la operación lechera que son usualmente poco percibidas por el productor; sin embargo generan disminución en la cantidad de leche total producida por lactancia y alteran la composición de la leche (Barbano *et. al*, 2006). La leche producida por una glándula mamaria afectada por mastitis subclínica es acopiada y almacenada con la producción láctea total del rebaño en el estanque de leche, para ser luego acopiada para su recepción en planta y posteriormente procesada para la elaboración de subproductos. .

Cuartos mamarios con IMI causada por *S. aureus* son el principal reservorio de este patógeno dentro del rebaño y en cuadros crónicos, el microorganismo se elimina intermitentemente a través de la leche (Sears *et. al* 1990; Blowey and Edmonson. 2010; Schukken *et. al* 2011). La prevalencia de IMI causadas por *S. aureus* puede variar entre operaciones lecheras. En las regiones del Biobío y Ñuble previamente reportamos que 107 operaciones lecheras evaluadas (62%) resultaron positivas en la identificación microbiológica y molecular de *S. aureus* en muestras de leche de estanque (Pacha, 2015).

Normalmente el diagnóstico de *S. aureus* desde muestras de leche, ya sea basado por sus características fenotípicas o genotípicas, es realizado a nivel de especie. Sin embargo, diferentes investigaciones realizadas en diversas partes del mundo describen una heterogénea diversidad de genotipos de *S. aureus* presentes tanto dentro como entre operaciones lecheras (Smith *et al.*, 2005; Capurro *et al.*, 2010; Gurjar *et. al.*, 2012; Boss *et. al*, 2016). Lo anterior nos permite plantearnos si el diagnóstico de *S. aureus* a nivel de especie de forma rutinaria dentro del rebaño es suficiente. Un grupo de investigadores ha consensado que pese a esta diversidad, usualmente es una ó un número limitado de cepas las causales de IMI dentro del rebaño (Zadoks *et al.*, 2011). Sin embargo, si sólo se realizan los métodos tradicionales de identificación a nivel de especie, no es posible identificar y diferenciar la o las cepas predominantes. En las provincias de Biobío y Ñuble la subtipificación de cepas de *S. aureus* aislados de muestras de leche de estanque utilizando RAPD-PCR detectó la existencia de una alta variabilidad de cepas entre operaciones lecheras (SID=1). En este estudio se identificaron en una misma operación lechera hasta 4 fenotipos que resultaron ser 4 genotipos diferentes de *S. aureus* en una misma muestra de leche de estanque (Pacha, 2015). Este estudio permite inferir que una diversidad de *S. aureus* se encuentra presentes en la región de Ñuble. No obstante, éste estudio considera sólo la evaluación cepas presentes en una muestra de leche de estanque, surgiendo la interrogante que sucede con el patrón de cepas de *S. aureus* entre muestras diferentes de BTM.

El poder de discriminación de la técnica utilizada en la subtipificación de especies bacterianas varía en cada técnica; por esto es importante considerar el seleccionar que sea capaz de poseer la sensibilidad y especificidad de clasificar una cepa igual o diferente según corresponda (Zadoks and Schucklen, 2006). Hoy en día, existe una amplia gama

de técnicas moleculares utilizadas en la subtipificación de subespecies de *S. aureus*, dentro de las cuales, la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado ha sido utilizada ampliamente durante los últimos 20 años (Zadoks *et al.*, 2002; Malachowa *et al.*, 2005; Haveri 2008; Zadoks *et al.*, 2011).

La virulencia de una cepa de *S. aureus* causante de una IMI, se relaciona con su capacidad de ingresar a la glándula mamaria y adherirse a las células del hospedador, evadir el sistema inmune, multiplicarse y diseminar la infección. Se postula que la presencia de factores de virulencia que permitan establecer y diseminar la infección dentro de la glándula mamaria diferenciarían una cepa causante de IMI de otra cepa putativamente ambiental. No obstante, aún no está claro cuál o cuáles son los factores de virulencia claves involucrados en la patogenia de *S. aureus* durante una IMI exitosa. Se han descritos más de 100 factores de virulencia presentes en el genoma de *S. aureus* (Arvidson and Tegmark, 2001; Khoramian *et al.*, 2015); de estos, en este trabajo de investigación se focalizaran en los factores de virulencia involucrados en las primeras etapas de patogenia como lo es en particular la adhesión a la células huésped o superficies a colonizar. En medicina humana se ha aislado consistentemente *S. aureus* en lesiones crónicas y materiales intrahospitalarios, atribuyendo esta persistencia, a su capacidad de adhesión y formación de biopelículas en superficies vivas e inertes (Davis *et al.*, 2008). A este respecto, las biopelículas o adherencias macroscópicas de *S. aureus* en el equipo de ordeño han sido reportadas por nuestro grupo de investigación recientemente (Latorre *et. al*, 2020).

La presencia de microorganismos intramamarios contagiosos en leche de estanque, como *S. aureus*, se asume que provienen principalmente de una glándula mamaria

infectada con el patógeno contagioso en cuestión. (Zadoks *et al.*, 2005). No obstante, el origen de estas cepas de *S. aureus* en leche de estanque puede corresponder a cepas extramamarias provenientes de sitios que toman contacto directo o indirecto con la leche ordeñada (Latorre *et. al*, 2020). Cepas de *S. aureus* han sido aisladas de sitios como piel del pezón, el canal de pezón, lesiones en la piel del pezón, manos del ordeñador y/o superficies del equipo de ordeña (Zadoks *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2008).

La capacidad de formar biopelículas es considerado un factor de virulencia que confiere, entre otras ventajas, una protección física frente a la acción del sistema inmune y antibióticos (*in vivo*); o agentes químicos de limpieza (en superficies inertes). La presencia de biopelículas y/o adherencias bacterianas en el equipo de ordeño podrían terminar, por arrastre mecánico, acopiadas en la leche de estanque (Latorre *et. al*, 2020). A este respecto, se ha reportado la presencia de cepas genéticamente indistinguibles de *L. monocytogenes* presentes en leche de estanque y adherencias macroscópicas del equipo de ordeña en una lechería de Nueva York (Latorre *et al.*, 2010). En la región de Ñuble, se han detectado superficies de equipo de ordeño con adherencias macroscópicas correspondientes a microorganismos agrupados en estructuras compatibles con biopelículas (Latorre and Munoz, 2015). La presencia de adherencias de microorganismos en el equipo de ordeño puede representar una fuente de UFC en la leche de estanque de esa operación lechera (Latorre *et. al*, 2010).

El objetivo del presente proyecto de investigación fue la subtipificación de pulsotipos, caracterizando de factores de virulencia y habilidad de adhesión de *S. aureus* aislados de leche de estanque y superficies del equipo de ordeño y del estanque de leche con adherencias macroscópicas, en operaciones lecheras de la región de Ñuble. De esta

forma, la presente investigación fue parcializada en 3 capítulos (Capítulo 2, 3 y 4) (**Figura 1.1**) en los que se realizó: i) Subtipificación de aislados de *S. aureus* identificados desde leche de estanque y adherencias macroscópicas presentes en el equipo de ordeño de acuerdo a su patrón genético o *fingerprint* ; ii) Caracterización de cepas de *S. aureus* de acuerdo al perfil de factores de virulencia de importancia en IMI (factores de adhesión a fibronectina (*fnbA*) e identificación de operón de cluster de adhesión intercelular (*ica*) e impacto en salud pública (enterotoxinas estafilocócicas e identificación de resistencia a Meticilina) iii) Evaluación de adherencias de cepas de *S. aureus* en ensayo de adherencia en microplaca.

Los aislados de *S. aureus* fueron identificados desde muestras de leche de estanque y superficies en contacto con leche con presencia de adherencias macroscópicas; recolectadas en el marco del Proyecto Fondecyt de Iniciación 11130343. Los aislados fueron recolectados posterior a la inspección de 30 lecherías de la región de Ñuble durante el periodo julio del 2014 a octubre del 2016. Los aislados de *S. aureus* en cada operación lechera fueron recolectados desde 3 muestras de leche de estanque consecutivas (ordeñas únicas y diferentes) y desde superficies en contacto con leche (equipo de ordeña, estanque de leche, tarro, etc.) con adherencias macroscópicas. Las muestras de leche de estanque fueron recolectadas de acuerdo a los protocolos del Consejo Nacional de los Estados Unidos (*National Mastitis Council*; NMC) (Jayarao *et al.*, 2004). La identificación de *S. aureus* fue realizada mediante identificación bacteriológica (morfología de colonia, coagulasa positiva) y confirmación por diagnóstico molecular identificando por PCR el segmento 23S del ARN ribosomal.

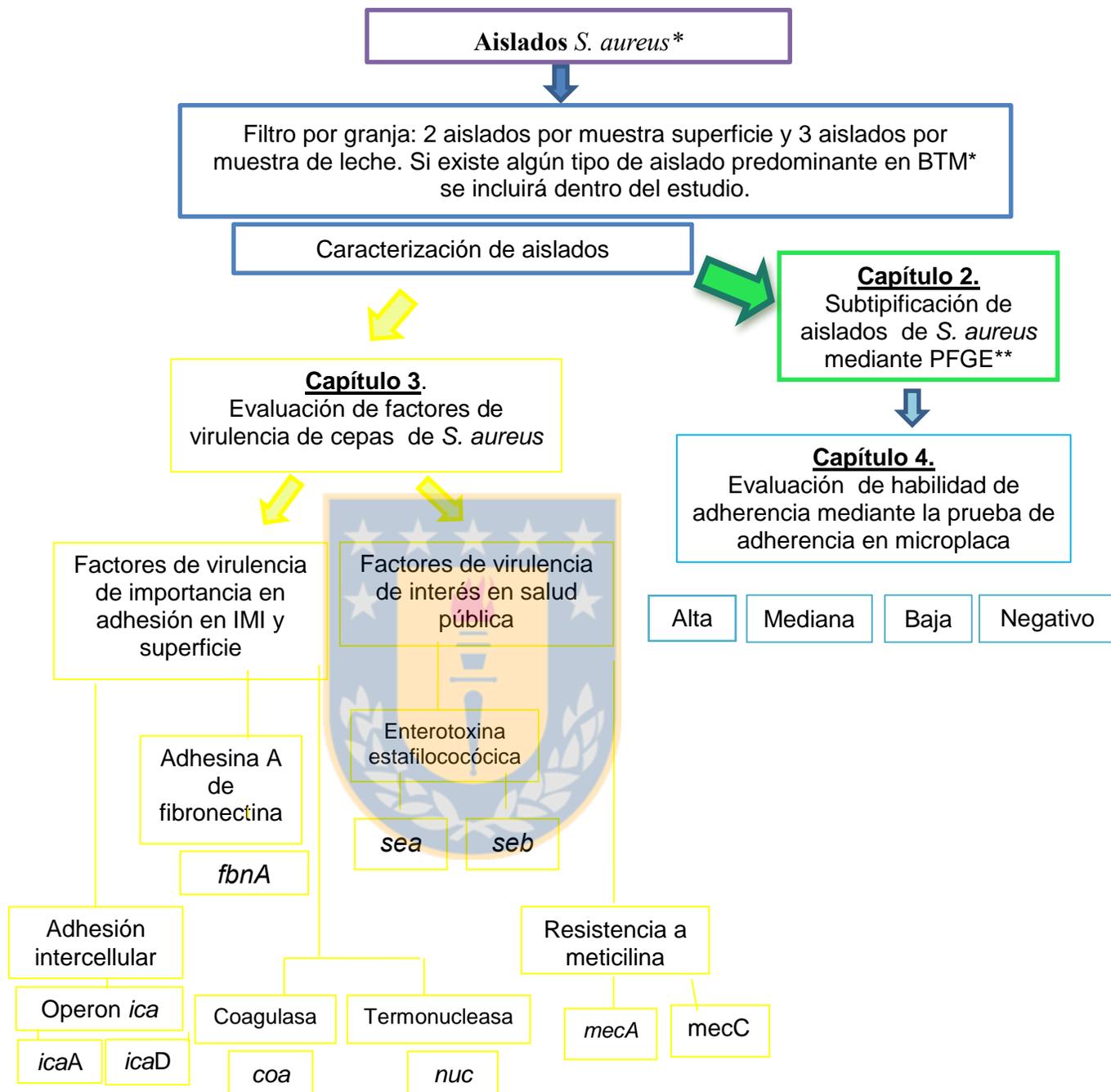
El objetivo principal del capítulo 2 es la subtipificación de *S. aureus* aislados desde muestras de leche y superficies del equipo de ordeño utilizando al protocolo de restricción enzimática con SmaI y electroforesis en gel de campo pulsado (**PFGE**) descrito por Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos. La diversidad de las cepas fue evaluada mediante la clasificación de su patrón genético utilizando el criterio de Tenover *et al.*, (1995). Adicionalmente, se utilizó el Índice de Discriminación de Simpson (**SID**) (Hunter and Gaston, 1988; Latorre *et al.*, 2011). Existe un amplio número de factores de virulencia descritos para *S. aureus* que pueden estar presentes o no, dependiendo de la cepa de *S. aureus*. Los factores de virulencia, a excepción de toxinas específicas de *S. aureus* (enterotoxinas estafilocócicas; **SE**, y la toxinas del síndrome del Shock tóxico, TSST-1), no son capaces de generar cuadros patológicos por sí solos (Arvisdon and Tegmark, 2001). De esta forma se ha definido que la interacción de los diferentes factores de virulencia de *S. aureus* permite el establecimiento y desarrollo de patologías asociadas a *S. aureus*. Durante el establecimiento de la infección de *S. aureus* es la adhesión de este a la superficie celular un momento crucial, el cual se realiza mediante un reconocimiento específico o no específico de diferentes proteínas.

En el capítulo 3 del presente trabajo se realizó la caracterización de los aislados de *S. aureus* factores de virulencia de importancia en el desarrollo de un IMI y de importancia en salud pública y se contrastó con la consistencia de estos factores de virulencia en cada cepa identificada. Diferencias entre grupos de cepas fueron evaluadas utilizando la prueba de Chi cuadrado o Fisher exact ( $\alpha \leq 0.05$ ).

En el capítulo 4, se evaluó la habilidad de adherencia *in vitro* de cepas de *S. aureus* identificadas entre las lecherías de la región de Ñuble y contrastó con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores.

En el capítulo 5, se describe los principales hallazgos identificados en la presente investigación y se contrastan con publicaciones anteriores. Finalmente, en base a los hallazgos identificados, proponemos posibles rutas epidemiológicas de diseminación de *S. aureus* dentro del rebaño lechero.

Una amplia diversidad de cepas de *S. aureus* ha sido identificada desde leche de estanque en operaciones lecheras de las regiones de Biobío y Ñuble. Actualmente, poco se sabe sobre la dinámica y características de las cepas de *S. aureus* identificadas desde leche de estanque y a nuestro conocimiento no existen reportes de aislados de *S. aureus* identificados de adherencias macroscópicas en superficies de equipo de ordeño. El identificar características comunes dentro del heterogéneo grupo de cepas de *S. aureus* basada en patrones de relevancia (factores de virulencia o habilidad de adherencia) permite caracterizar rasgos de las cepas de *S. aureus* presentes en la región de Ñuble.



**Figura 1.1** Esquema de trabajo para la caracterización molecular, evaluación de factores de virulencia y habilidad formadora de adherencia de *Staphylococcus aureus* aislados desde leche de estanque y superficies del equipo de ordeña en lecherías de la región de Ñuble, Chile. BTM: muestra de leche de estanque; PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado. Fuente: Elaboración Propia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arvidson, S., and Tegmark, K. 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. International journal of medical microbiology, 291(2), 159-170. Arvidson
- Barbano, D.M., Y. Ma, and M. V. Santos. 2006. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. J. Dairy Sci. Vol. 89 (E. Suppl.): 15–19.
- Blowey R, and P. Edmonson. 2010. Mastitis Control in Dairy Herds. (2nded.). CAB international. Wallingford, UK.
- Boss, R., A. Cosandey, M. Luini, K. Artursson, M. Bardiau, F. Breitenwieser, E. Hehenberger, Th. Lam, M. Mansfeld, A. Michel, G. Mösslacher, J. Naskova, S. Nelson, O. Podpečan, A. Raemy, E. Ryan, O. Salat, P. Zangerl, A. Steiner, and H.U. Graber. 2016. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. Journal of Dairy Science 99:515–528. doi:10.3168/jds.2015-9589
- 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.
- Davis, S. C. Ricotti, A. Cazzaniga, E. Welsh, W. Eaglstein and P. Mertz. 2008. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. Wound Rep Reg 16: 23-29.

- 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*. Vol. 28(3): 565-576.
- 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.
- 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* 26:2465–2466.
- 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.
- Joo, YS, LK Fox, WC Davis, GA Bohach, YH Park. 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet Microbiol*80, 131-138.
- Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., & Emaneini, M. 2015. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial pathogenesis* 88, 73-77.
- 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. A., J. A. S. Van Kessel, J. S. Karns, M. J. Zurakowski, , A. K. Pradhan, K. J. Boor, E. Adolph, S. Sukhnanand and Y. H. Schukken. 2011. Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3676-3684.

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.

Latorre, A.A., P.A. Pachá, G. González-Rocha, I. San Martín, M. Quezada-Aguiluz, A. Aguayo-Reyes, H. Bello-Toledo, R. Oliva, A. Estay, J. Pugin, and M.A. Muñoz. 2020. On-Farm Surfaces in Contact with Milk: The Role of *Staphylococcus aureus*-Containing Biofilms for Udder Health and Milk Quality. *Foodborne Pathogens and Disease*. doi:10.1089/fpd.2019.2704.

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*

Pacha, P. 2015. Evaluación de la diversidad genética de *S. aureus* aislados desde leche de estanque de operaciones lecheras de las provincias de Biobío y Ñuble. Tesis

de magíster para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias. Escuela de Postgrado. Universidad de Concepción.

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.

Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., and Pfizer Mastitis Research Consortium. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. Veterinary immunology and immunopathology 144(3): 270-289.

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.

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.

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., H.F. Schulte and L. Tokofsky. 2005. Molecular tools enhance the value of bulk tank milk. NMC Annual meeting proceedings. Pp: 86-93.

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*. Vol. 16(4): 357–372.



## CAPITULO 2

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* AISLADOS DE LECHE DE ESTANQUE Y ADHERENCIAS EN EQUIPO DE ORDEÑO

#### INTRODUCCIÓN

Las IMI causadas por *S. aureus* han sido objeto de estudio desde la década del 70 hasta la actualidad (Anderson, 1976; Barkema *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2015; Ruegg *et al.*, 2017). Sin embargo, pese que en estos últimos 50 años se han generado conocimientos diversos en la epidemiología de *S. aureus* en operaciones lecheras, el control eficaz de este microorganismo aún es limitado (Zadoks 2002, Haveri *et al.*, 2008).

El cultivo bacteriológico de leche de cuartos mamarios para el aislamiento de *S. aureus* es utilizado como un indicador de IMI dentro del rebaño. Adicionalmente, el cultivo bacteriológico de muestras de leche de estanque es implementado en programas de vigilancia para la identificación de microorganismos contagiosos causales de IMI, como es el caso de la mayor parte de las cepas de *S. aureus* asociadas a mastitis (Jayarao *et al.*, 2004, Zadoks *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2004, Van Slykke *et al.*, 2008). El diagnóstico incorrecto en casos de IMI causadas por *S. aureus*, generan tanto pérdidas económicas como también repercuten en el estado sanitario del rebaño. *Staphylococcus aureus* es eliminado de forma intermitente a través de la leche de un cuarto mamaria infectado, por lo que muestras de leche negativa pueden coincidir con periodos de no eliminación del patógeno, dando así falsos negativos. El aumento en el número de muestras de leche en ordeñas diferentes permite aumentar las probabilidades de aislar e identificar *S. aureus* (Sears *et al.*, 1990). Tradicionalmente, la identificación de *S. aureus* a partir de

muestras de leche ha sido realizada basándose en: a) visualización de bacterias Gram positivas en agrupaciones con forma de racimo, b) colonias blanco-amarillentas hemolíticas ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) en agar sangre; y c) respuestas positivas a las pruebas de catalasa y coagulasa (Bautista-Trujillo *et. al*, 2013) (Figura 2.1). Ésta clasificación usualmente utilizada en el análisis de laboratorio, excluye aislados de *S. aureus* no “típicos” identificados en menor proporción como es el caso de aislados que no presentan hemólisis en placas de agar sangre (Oliver *et al.*, 2004) o son negativos a la prueba de coagulasa (Lange *et al.*,2015). Por otro lado, los aislados que cumplen con las características morfológicas anteriormente señaladas, son normalmente clasificados indistintamente como *S. aureus*, pues se asume que el número de aislados de *Staphylococcus* coagulasa positivo (SCP) diferentes a *S. aureus* identificados previamente en muestras de leche es variable y normalmente de baja prevalencia (Phillips and Kloos, 1981; Biberstein *et al.*, 1984; Roberson *et. al* 1998; Boerlin *et al.*, 2003; Oikonomou *et al.*, 2012, Taponen *et al.*, 2012). La prueba de acetoina también conocida como Voges Proskauer (Werkman, 1930) es recomendada por el NMC para la diferenciación de *S. aureus* (acetoina positivo) con otras especies de SCP acetoina negativas como *S. intermedius* o *S. hyicus*; especies previamente identificadas desde muestras de leche IMI (Capurro *et. al.*, 1998, Oikonomou *et. al.*, 2012). No obstante, considerando que una amplia variedad de pruebas fenotípicas y protocolos de laboratorio pueden ser utilizados en el diagnóstico de *S. aureus*, es importante considerar que la menor proporción de cepas de *S. aureus* con una respuesta atípica en las pruebas fenotípicas (tales como el índice analítico de perfil (API), coagulasa o Voges Proskauer puede ser subdiagnosticada (Boerlin *et. al.*, 2003, Lange *et al.*, 2015). De esta

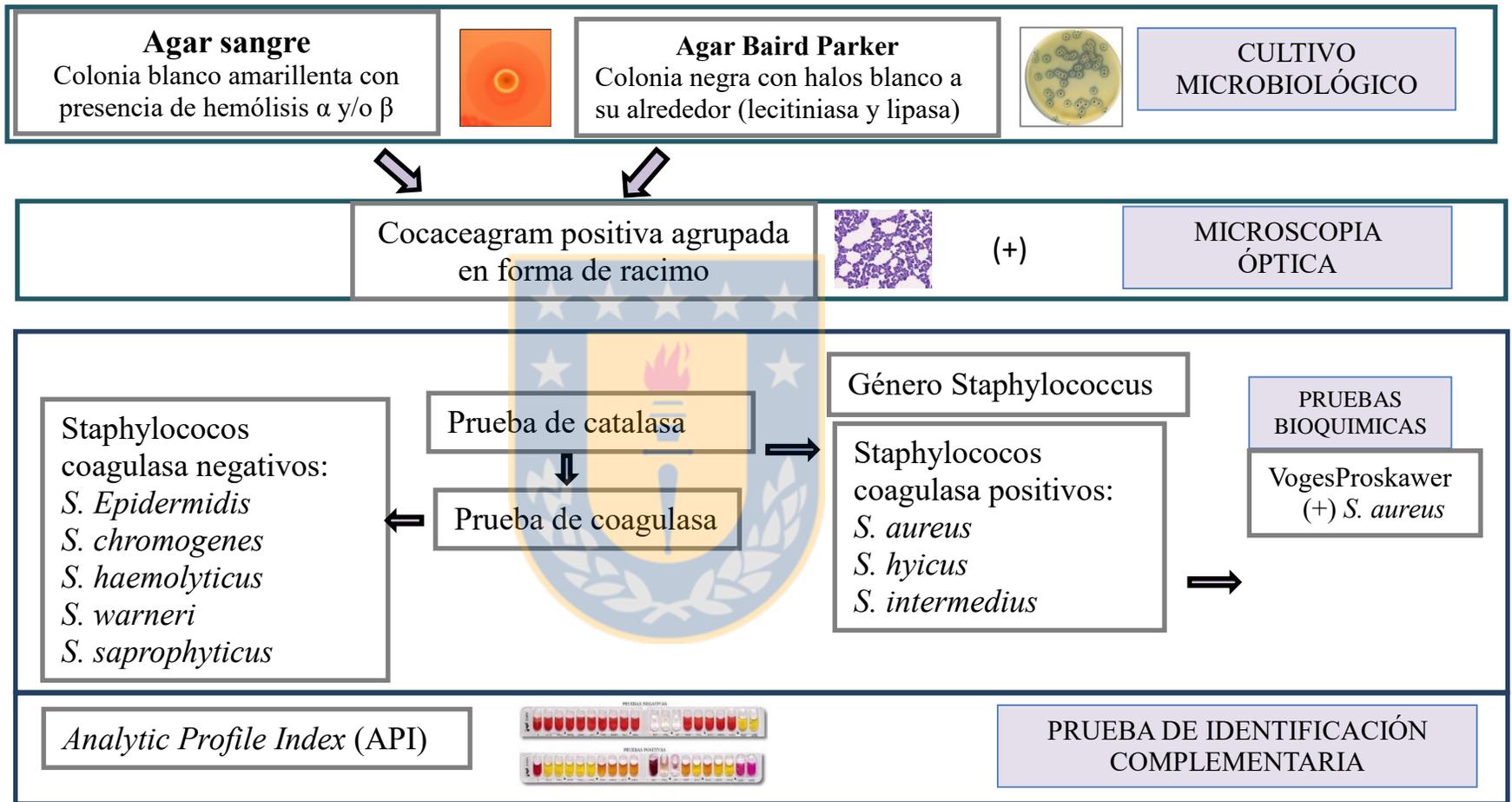


Figura 2.1 Esquema de identificación fenotípica de *S. aureus* basada en métodos bacteriológicos tradicionalmente utilizados en el diagnóstico de especies de *Staphylococcus*. Fuente: Elaboración Propia.

forma, es importante tener presente que los métodos fenotípicos están basados en la expresión de características de aislados, mientras que la detección por métodos moleculares busca los segmentos de ADN que codifican estas características (Zadoks, 2007).

El diagnóstico molecular ha sido utilizado exitosamente para identificar especies y subespecies bacterianas causantes de IMI en rebaños lecheros (Zadoks and Schukken 2006, Zadoks *et. al.*, 2011). Genes *housekeeping* son codificados por regiones genéticas altamente conservadas y que representan una herramienta útil para la identificación de microorganismos (Gil *et. al.*, 2004, Zadoks and Schukken, 2006). La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain reaction*, PCR) es una técnica molecular que puede ser utilizada para identificar segmentos específicos de ADN que usualmente codifican genes *housekeeping*. Más allá, la técnica de PCR ha probado ser una técnica robusta y específica para la identificación de patógenos intramamarios (Riffon *et al.*, 2001). Herramientas moleculares como PCR complementando la identificación microbiológica permiten aumentar la sensibilidad de diagnóstico de *S. aureus* aislados de operaciones lecheras (Pacha, 2015). Debido a la amplia diversidad de cepas de *S. aureus* descritas en la literatura, es importante implementar considerar técnicas de subtipificación que permitan distinguir entre cepas diferentes. Durante la subtipificación de un microorganismo la definición clara entre los conceptos de aislado y cepa es necesaria. Los aislados son cultivos puros presumiblemente derivados de un mismo microorganismo; de esta forma una colonia de *S. aureus* obtenida desde una muestra de leche, corresponde a un aislado. Por otro lado, una cepa corresponde a un aislado o grupos de aislados distinguidos unos de otros por características fenotípicas o genotípicas. En este sentido, a una cepa de *S. aureus* resistente a un antimicrobiano

como el caso de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA), es considerada una cepa diferente respecto a la cepa *Staphylococcus aureus* Meticilino sensible (Zadoks and Schukken, 2006). Llevando el ejemplo en el marco de la identificación genotípica a utilizar en la presente investigación, dos aislados corresponden a una misma cepa cuando los patrones de banda de ADN, presentan el mismo número y tamaño de fragmento sin considerar intensidad de banda (Munoz and Zadoks, 2007).

De esta forma 2 aislados clasificados como una misma cepa poseen el mismo patrón de banda de ADN y provienen de un clon común (Tenover *et. al.*, 1995). Una amplia variabilidad genética de cepas de *S. aureus* ha sido descrita consistentemente entre operaciones lecheras del mundo; con algunas cepas clonales de *S. aureus* que han sido aisladas en diferentes países (Enrigh *et. al.*, 2000; Smith *et. al.*, 2005). A este respecto, un conjunto multidisciplinario e intercontinental (diferentes países de América y Europa) de investigadores especialistas en el tema ha consensuado que, pese a la amplia diversidad y distribución de cepas de *S. aureus* posibles de aislar dentro de un mismo rebaño, son algunas cepas las consideradas predominantes y responsables de causar IMI (Zadoks *et. al.*, 2011). Este consenso respalda con una misma cepa de *S. aureus* ha sido aislada desde la mayoría de las de IMI en un mismo rebaño (Aarstrup *et al.*, 1995; Larsen *et. al.*, 2000; Anderson *et. al.*, 2006). Sin embargo, Gurjar *et. al.* (2013) describe el comportamiento de diversas cepas de *S. aureus* causantes de IMI dentro de un mismo rebaño, describiendo un comportamiento de infección ambiental a un microorganismo normalmente clasificado como contagioso. Por lo anterior, se infiere que la epidemiología de *S. aureus* podría ser variable de acuerdo a cada rebaño. Las herramientas moleculares son utilizadas hoy en día en medicina veterinaria para

describir la epidemiología de diferentes patógenos intramamarios dentro de los que se incluye *S. aureus* (Zadoks and Schukken, 2006; Zadoks *et al.*, 2011).

Hoy en día se describen variadas técnicas moleculares utilizadas en la subtipificación de subespecies de *S. aureus* aisladas de IMI (Zadoks *et al.*, 2011), entre las que se incluyen: ribotipificación (Zadoks *et al.*, 2001), tipificación de locus de secuencias (MLST) (Smith *et al.*, 2005) tipificación por el gen *spa* codificador de proteína A (Shopsin *et al.*, 1999), gen de coagulasa, microarreglos, secuenciamiento y comparaciones de genoma completo, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR) (Gurjar, 2012) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Zadoks *et al.*, 2001). La técnica utilizada en la tipificación de aislados es clave para identificar correctamente las cepas existentes dentro de una misma especie. Maslow *et al.* (1993), propone 5 criterios en la elección de sistemas de subtipificación: capacidad de tipificación, reproducibilidad, poder de discriminación, facilidad de uso e interpretación de resultados (Riley *et al.*, 2004).

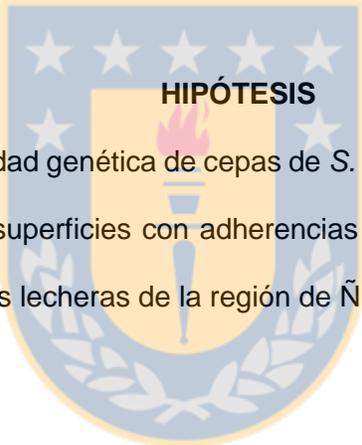
La técnica de PFGE consiste brevemente en que se realiza la ruptura de su pared celular dejando el material genético, para posteriormente en realizar la restricción enzimática del genoma generando fragmentos de ADN, los que serán separados en un gel de agarosa sometido a un campo pulsado eléctrico en ángulos diferente. La ejecución de la técnica de PFGE, demora más que otras técnicas de tipificación (aproximadamente 1 semana por cada 12 aislados, dependiendo del número de equipos disponibles) y requiere un pulsador de corriente especial para la migración de los fragmentos de ADN en el gel. Sin embargo, la técnica de PFGE es una técnica de librería ampliamente estandarizada, altamente reproducible, con un alto poder de discriminación y utilizada como técnica *Gold standard* para la subtipificación de microorganismos, como *S. aureus*.

Por las ventajas descritas anteriormente la técnica de PFGE fue seleccionada en la presente investigación.

La técnica de PFGE posee un mayor poder de discriminación respecto a RAPD-PCR (Saulnier *et. al.*, 1993; Sabat *et. al.* 2006). Una amplia diversidad de cepas de *S. aureus* entre muestras de leche de estanque de operaciones lecheras de las Región del Biobío y Ñuble han sido identificadas por RAPD-PCR (Pacha, 2015). De un total de 38 operaciones lecheras evaluadas para la identificación de *S. aureus* (microbiológica y genética), 50% de las operaciones lecheras resultaron positiva a *S. aureus* (Pacha 2015, datos no publicados). Estos datos podrían subdiagnosticar el número real de operaciones lecheras positivas a *S. aureus*, considerando la eliminación intermitente de *S. aureus* desde IMI subclínicas y que sólo una muestra de leche fue recolectada (Sears *et al.*, 1990). Un aumento en la frecuencia de muestreo de leche de estanque permitirá incrementar la sensibilidad de identificación de aislados de *S. aureus* en operaciones lecheras.

La detección de biopelículas en superficies de ordeña de la región de Ñuble (Latorre y Muñoz, 2015) identifica un nicho de microorganismos, incluido *S. aureus*, que podrían ser causal de contaminación de la leche de estanque del rebaño.

En este capítulo se evaluará la diversidad genética de aislados de *S. aureus* entre y dentro de las operaciones lecheras identificados desde muestras seriadas de BTM y desde superficies con presencia de adherencia macroscópicas en superficies del equipo de ordeño (AMES). Las cepas identificadas fueron agrupadas en cepas presentes en leche de estanque, cepas presentes en adherencias macroscópicas y cepas presentes en superficie(s) y leche de estanque.

The logo of the Universidad de Ñuble is a shield-shaped emblem. It features a blue background with a yellow border. At the top, there are five white stars. In the center, there is a yellow shield containing a blue torch with a red flame. Below the shield, there is a blue laurel wreath.

## HIPÓTESIS

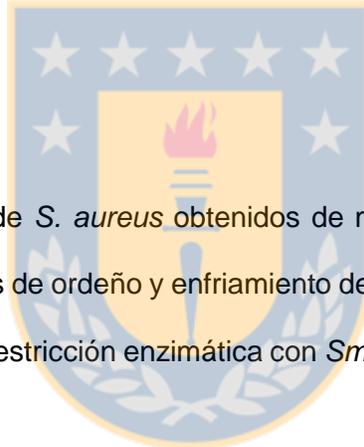
Existe una amplia diversidad genética de cepas de *S. aureus* entre aislados de muestras de leche de estanque y superficies con adherencias en equipo de ordeño en contacto con leche de operaciones lecheras de la región de Ñuble.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la diversidad de aislados de *S. aureus* obtenidos desde muestras de leche de estanque y superficies de equipos de ordeño y enfriamiento de operaciones lecheras de la región de Ñuble.

### **Objetivos específicos.**

1. Subtipificar aislados de *S. aureus* obtenidos de muestras de leche de estanque y superficies de equipos de ordeño y enfriamiento de operaciones lecheras de la región de Ñuble, utilizando restricción enzimática con *Sma*I y electroforesis en gel de campo Pulsado.
2. Evaluar la diversidad de cepas de *S. aureus* presentes dentro y entre operaciones lecheras de la región de Ñuble mediante el Índice de Diversidad de Simpson.



## MATERIALES Y MÉTODO

### ***Tamaño muestral de lecherías para identificación de S. aureus***

La recolección de aislados de *S. aureus* fue realizada en el marco de desarrollo del proyecto FONDECYT de Iniciación 11130343. Brevemente, un total de 30 operaciones lecheras de la región de Ñuble fueron muestreadas para la identificación de los aislados de *S. aureus* desde muestras de leche de estanque y superficie. El tamaño muestral de operaciones lecheras muestreadas fue calculado utilizando el programa Win Episcopo considerando un universo de 61 operaciones lecheras activas al momento del inicio del Proyecto (2013). Los criterios de inclusión de operaciones lecheras de la región fueron lecherías con unidades de ordeño fijas y estanque de enfriamiento de leche. Los aislados de *S. aureus* fueron identificados desde 2 tipos de muestras: muestras de leche de estanque y muestras de adherencias macroscópicas en superficies de equipo de ordeña y/o superficies en contacto con leche. Al ser desconocida la calidad microbiológica de la leche de estanque de las operaciones lecheras de la Provincia de Ñuble, se consideró una prevalencia de no-cumplimiento de parámetros de calidad microbiológica de leche de estanque de un 50% (usando como referencia los parámetros descritos por Jayarao *et. al.*, 2004), un nivel de confianza de 95% ( $\alpha= 0.05$ ), un error de muestreo de 10%. De esta forma, el tamaño calculado de muestra correspondió a 38 operaciones lecheras, no obstante debido a la disminución importante del número de operaciones lecheras activas al 2016 en la provincias pertenecientes a la región de Ñuble se muestrearon un total de 30 lecherías.

### ***Identificación de S. aureus desde muestras de leche de estanque y superficies con adherencias macroscópicas***

Por operación lechera, se realizaron 3 muestreos de BTM de ordeñas seriadas de acuerdo con lo recomendado por el Dr. Bushan Jayarao (comunicación personal), para una obtención de resultados representativos. Cada muestra BTM correspondió a una única ordeña completa del rebaño, y recolectada posterior a su enfriamiento a una temperatura menor a 5°C y a su homogenización por mínimo 10 min. Las muestras de leche fueron recolectadas al menos, durante tres días consecutivos. La recolección de muestras de superficies con adherencias macroscópicas y en contacto con la leche, fue realizada en superficies del equipo de ordeña y enfriamiento durante una única inspección por operación lechera. El protocolo de muestreo utilizado tanto para muestras de leche de estanque como para superficies fue realizado de acuerdo con lo descrito por Jayarao *et. al.* (2004) y Latorre *et. al.* (2010), respectivamente. Los protocolos de cultivo microbiológico para las muestras fue realizado de acuerdo a lo descrito por Jayarao *et. al.* (2004) y Latorre *et. al.* (2020).

### ***Identificación de aislados de S. aureus***

Entre 1 y 6 colonias con morfología putativa de *S. aureus* por muestra (dependiendo de la densidad del cultivo) fueron traspasadas a medio selectivo y diferencial (Agar Baird-Parker) para posteriormente obtener cultivo puro y colonias aisladas. Cada aislado fue almacenado sembrando una colonia aislada en Agar Cerebro Corazón (*Brain Heart Infusion Agar*, BHIA) y posteriormente almacenados a -80°C en Cryobank® (Copan Diagnostic, Ca 92562, Estados Unidos), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A todos los aislados identificados presuntivamente como *S. aureus* por características microbiológicas, se les realizó la extracción de ADN de acuerdo a las indicaciones de

Adwan (2011), para posteriormente ser confirmados por PCR al amplificar la secuencia del segmento 23S de *S. aureus* utilizando los partidores *Sau* 327: 5'-GGACGACATTAGACGAATCA-3' y *Sau* 1645: 5'-CGGGCACCTATTTTCTATCT-3' descritos por Riffon *et. al* (2001). Las condiciones de amplificación para el set de primer *Sau* 327/1645 fueron a) 1 ciclo a 94°C por 2 min b) 35 ciclos de: 94°C por 45 s, 64°C por 1 min y 72°C por 2 min c) 1 ciclo a 72°C por 10 min (Riffon *et. al.*, 2001). Como control positivo en la identificación de *S. aureus*, se incluyó a *S. aureus* ATCC 25923. Para trabajar con un número representativo pero manejable de aislados, en aquellas muestras con un número de aislados mayor a 4, se seleccionaron de forma aleatoria un máximo de 3 aislados por tipo de muestra. No obstante, sí en estas muestras se identificaba un aislado predominante respecto a los otros (basado en su morfología de colonia en la placa original), este aislado se seleccionó de forma dirigida, si no fue seleccionado en primera instancia en el sorteo aleatorio.

### ***Subtipificación de aislados de S. aureus por electroforesis en Gel de Campo Pulsado***

La subtipificación de aislados de *S. aureus* fue realizada utilizando la digestión con enzima de restricción *Sma*I y PFGE de acuerdo con el protocolo descrito por el Centro de Control y Enfermedad de los Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention*) para *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente, con pequeñas variaciones. El proceso de preparación de *plugs* y lisis bacteriana fue realizado en los Laboratorios de calidad de Leche de la Universidad de Concepción, Campus Chillán. Brevemente, cada aislado fue cultivado por aproximadamente 24h a 37°C y posteriormente las colonias necesarias fueron resuspendidas en 3 mL de TE buffer estéril hasta alcanzar una absorbancia entre los rangos de 2.5 a 2.9 nm (Eppendorf

Biophotometer, AG 22331, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, 300µl de la suspensión fueron transferidos a un tubo estéril de microcentrífuga (1500uL) y centrifugados a 13000 rpm por 4 minutos. El sobrenadante obtenido fue descartado y el pellet resuspendido en 300 µl de TE buffer estéril. Cada tubo con la suspensión bacteriana se acondiciono a 37°C por 10 min, para posteriormente agregar 4 µl de lisostafina 1mg/mL (Sigma-L7386) y 300 µL de agarosa 1.8% (SeaKem® Gold Agarose, Lonza, Maine, Estados Unidos) a 55°C. Posterior a su solidificación a temperatura ambiente por 10 min, se preparó un *plug* por aislado. Posteriormente, para realizar la lisis celular, cada *plug* fue dispuesto en 3 ml de buffer de lisis EC a 37°C por 4 horas. Finalizado este periodo de tiempo, 4 lavados en agitación de 30 minutos con buffer TE fueron realizados. Cada *plug* fue cortado en 2x5mm y almacenados a 4°C para ser trasladado al Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos de la Universidad de Concepción en el Campus Concepción. Las etapas de digestión enzimática y corrida de gel en campo pulsado se subdividieron en lotes de 12 aislados considerando un orden por operación lechera que concordase de mejor forma el número de aislados por gel. Para la digestión enzimática, cada *plug* fue pre-acondicionado con 100µL de mezcla buffer-agua estéril a 25°C por 35 minutos (Stock Buffer Multicore 10X Promega). Finalizado este periodo se agregó 97µL de solución Buffer Multicore-Albumina Sérica Bovina-Agua estéril (10: 1: 86). Posteriormente se agregaron 3µL enzima de restricción SmaI (10 unidades/µl, Promega). La digestión enzimática se mantuvo a 25°C por un período de 3,5 horas. Finalizado el tiempo de digestión se dispusieron 12 *plugs* en el gel de agarosa al 1% (14x13cm) preparado con GelRed1X (Biotium). Los parámetros de corrida de PFGE para *S. aureus* fueron de 200 V (6V/cm), con *switch* inicial de 5 segundos, *switch* final de 40 segundos por un tiempo de 21 horas a una temperatura de

4°C. En cada lote de corrida de cada gel se incluyó como estándar de normalización *Salmonella* serotipo Branderup cepa H9812, rutinariamente utilizada como estándar por el CDC para la subtipificación de cepas como *Listeria monocytogenes* (Latorre *et. al*, 2011) entre otras, y que en Chile es utilizada por el Instituto de Salud Pública para la subtipificación de *S. aureus* Meticilino resistentes. Los plugs de *Salmonella* fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del CDC ([www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar\\_mras\\_PFGE\\_s\\_aureus.pdf](http://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf)), digeridos por la enzima de restricción *XbaI* (Promega) a 37°C por 2 horas con 30 minutos.

#### ***Criterios de subtipificación de cepa de S. aureus***

La subtipificación de los aislados de *S. aureus* fue realizada mediante inspección visual utilizando el criterio descrito por Tenover *et. al* (1995), realizando el análisis de patrón de bandas de ADN obtenidas por la digestión con *SmaI* y electroforesis en campo pulsado. La evaluación e interpretación de los patrones de bandas de ADN obtenidos fue realizada de forma visual por dos observadores imparciales de acuerdo con lo descrito por Muñoz and Zadoks (2007). Utilizando el criterio descrito por Tenover (1995); cepas con diferencias en 4 ó más bandas de fueron consideradas cepa genéticamente no relacionadas y le fue asignado una identificación única con letra mayúscula (pulsotipo A, pulsotipo B, etc.). Aquellas cepas con diferencias de hasta 3 bandas, fueron consideradas relacionadas genéticamente, asignándoles una sub-identificación numérica de acuerdo con la cepa que se relacionada (A1, A2, etc.) (Zadoks *et. al* 2002). De forma complementaria, se realizó un análisis de los *clusters* con el programa BioNumerics 7.6 utilizando el algoritmo (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, UPGMA) con el coeficiente de Dice con tolerancia de 1.5% (Latorre *et. al.*, 2011).

**Análisis estadístico.** Los resultados de frecuencia de aislados y cepas de *S. aureus* fueron realizados utilizando métodos de estadística descriptiva, presentados en tablas de frecuencias. La diversidad genética de cepas de *S. aureus* dentro y entre operaciones lecheras fue realizada utilizando métodos de estadística descriptiva y el Índice de Discriminación de Simpson (SID) con un intervalo de confianza de un 95% (Hunter and Gaston, 1988, Antonios *et. al*, 2015).

**Índice de discriminación de Simpson:**

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

S = número de especies (cepas)

N = total de *S. aureus* presentes (o unidades cuadradas)

n = número de ejemplares por especie (cepas).

**Financiamiento.** Este proyecto fue co-financiado por el Proyecto FONDECYT de iniciación 11130343, y el Laboratorio de Calidad de Leche, Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción. Adicionalmente, se recibieron fondos de CONICYT para el desarrollo de tesis de doctorandos becarios con Folio beca 21140108.

## RESULTADOS

### **Operaciones lecheras y muestras *S. aureus*<sup>(+)</sup>**

Un total de 214 aislados de *S. aureus* se identificaron desde las muestras *S. aureus*<sup>(+)</sup> en 23 lecherías, variando en la frecuencia por lechería de 1 (Lechería 15) hasta 53 (Lechería 12) aislados. De esta forma, 113 aislados de origen en BTM y 53 de AMES fueron incluidos en la evaluación de diversidad genética de *S. aureus* (**Anexo 1**). Los 53 aislados de *S. aureus* identificados desde superficies con adherencias macroscópicas incluyen superficies de: pezoneras (n=8, lechería 12), colector de leche (n=4; lechería 10 y 30), válvula del colector (n=2; lechería 12), tubo corto de leche (n=2; lechería 12), manguera de leche (n=4; lecherías 10 y 12), línea de leche a 2.5 m y 60cm (n=7; granja 16), salida interna del estanque (n=2, lechería 12), salida externa del estanque (n=2; lechería 12), aspas agitadoras del estanque (n=2, lechería 12), tarros de leche (n=13; lecherías 12, 18 y 19), jarra de leche (n=2; lechería 1), tapa de jarra de leche (n=2; lechería 28), y manguera de leche utilizada para leche mastítica (n=3; lecherías 1 y 2).

### **Pulsotipos de *S. aureus***

Posterior a la subtipificación de los 166 aislados de *S. aureus* realizada por la enzima de restricción *Sma*I y electroforesis en gel de campo pulsado (**PFGE**), se identificaron 42 pulsotipos totales categorizados como 23 pulsotipos principales (A-W) y 19 subtipos (**Figura 2.2; Anexo 1**).

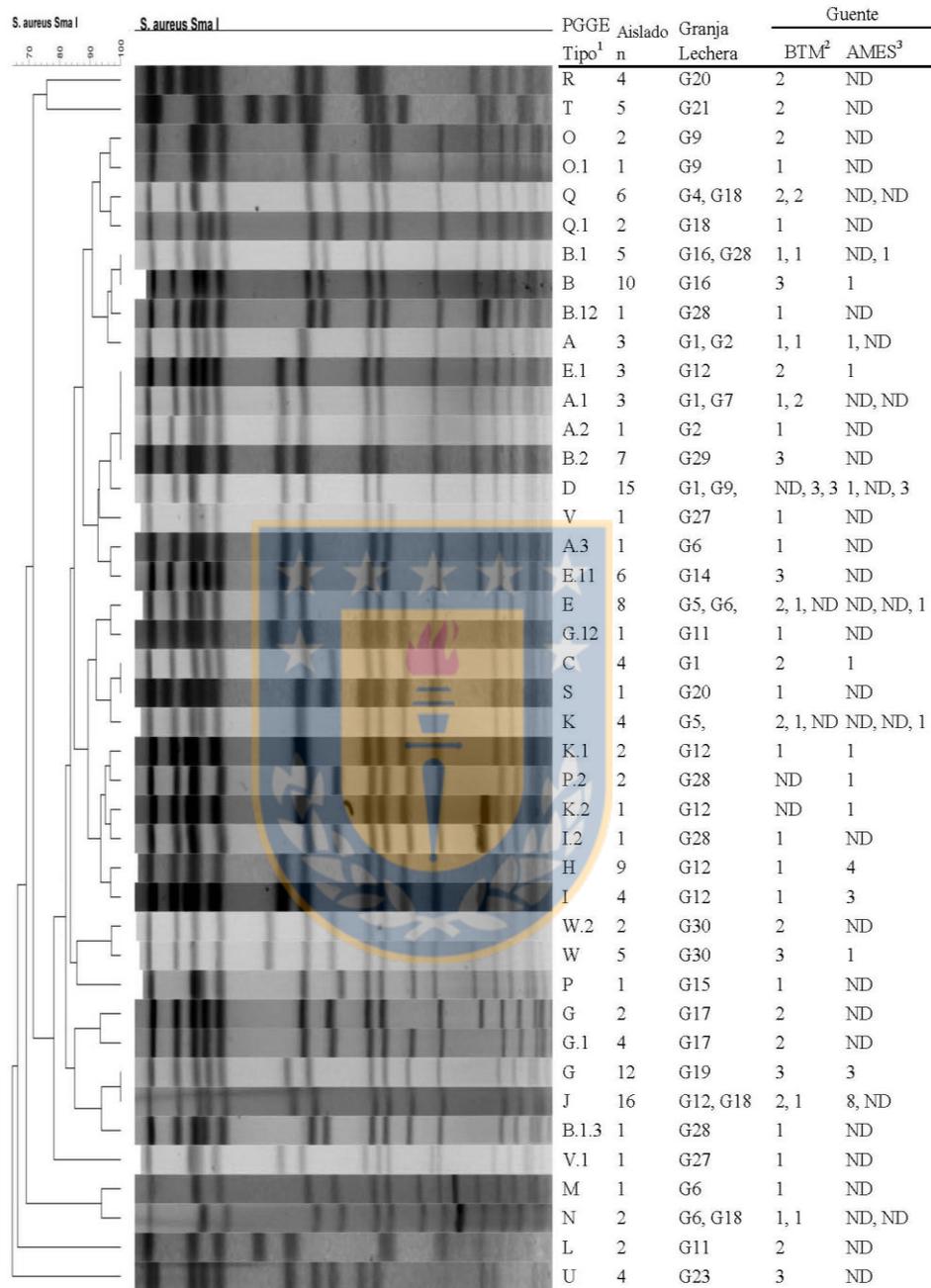
### ***Distribución de cepas de S. aureus entre lecherías***

Entre las 23 lecherías-*S. aureus* (+), fue identificada una alta diversidad de pulsotipos de *S. aureus* (Índice de Diversidad de Simpson; **SID** = 0,99). Los pulsotipos M, N, L, R, T, U y V.1 son los pulsotipos genéticamente más lejanos (**Figura 2.2**). De los 42 pulsotipos, 33 (78,5%) pulsotipos sólo se aislaron en una lechería, y 9 (21.5%) pulsotipos se identificaron distribuido en 2 ó 3 operaciones lecheras (A, A.1, B.1, D, E, J, K, N, Q). De los pulsotipos identificados en más de una lechería, 7 procedían de lecherías localizadas en comunas diferentes (**Figura 2.3**). El pulsotipo D, E y K son los pulsotipos más predominante identificados entre lecherías, en muestras de BTM y AMES.

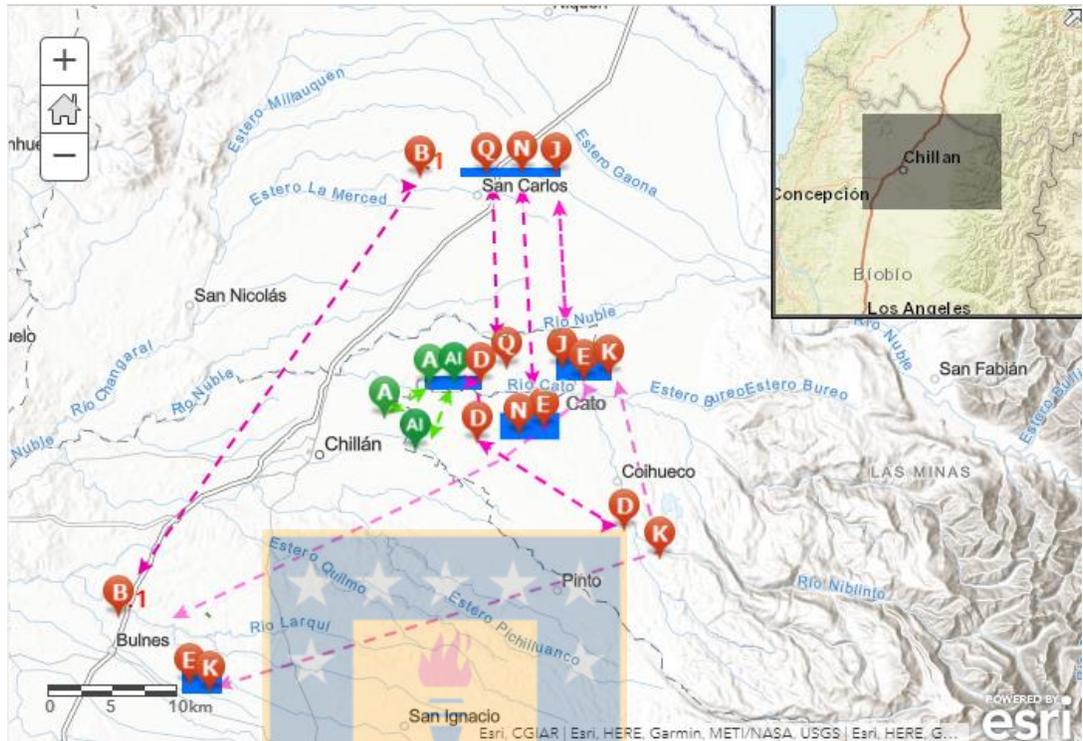
### ***Distribución de cepas de S. aureus dentro de lecherías***

La diversidad genética de *S. aureus* dentro de las lecherías varió entre cada lechería (**Anexo 2**); siendo el SID calculada en 22 lecherías, excluyendo la lechería 15, en la que sólo un aislado de BTM fue identificado. Dentro de las lecherías, la diversidad genética de las cepas vario entre homogénea (SID=0) a altamente heterogénea (SID=1), identificándose 4 grupos: 8 lecherías con un único pulsotipo de *S. aureus*; 5 lecherías con sólo pulsotipos estrechamente relacionados; 5 lecherías con pulsotipos estrechamente relacionados y no relacionados; y 2 lecherías con sólo pulsotipos de *S. aureus* no relacionados (**Tabla 2.1**).

La frecuencia de cepas de *S. aureus* entre las 3 muestras seriadas de leche de estanque por lechería varió en las diferentes lecherías, identificándose 13 patrones diferentes de frecuencia de cepas de *S. aureus* (**Figura 2.4; Anexo 1**). De esta forma, un único pulsotipo fue identificado en 3, 2 y 1 muestras de BTM para 6

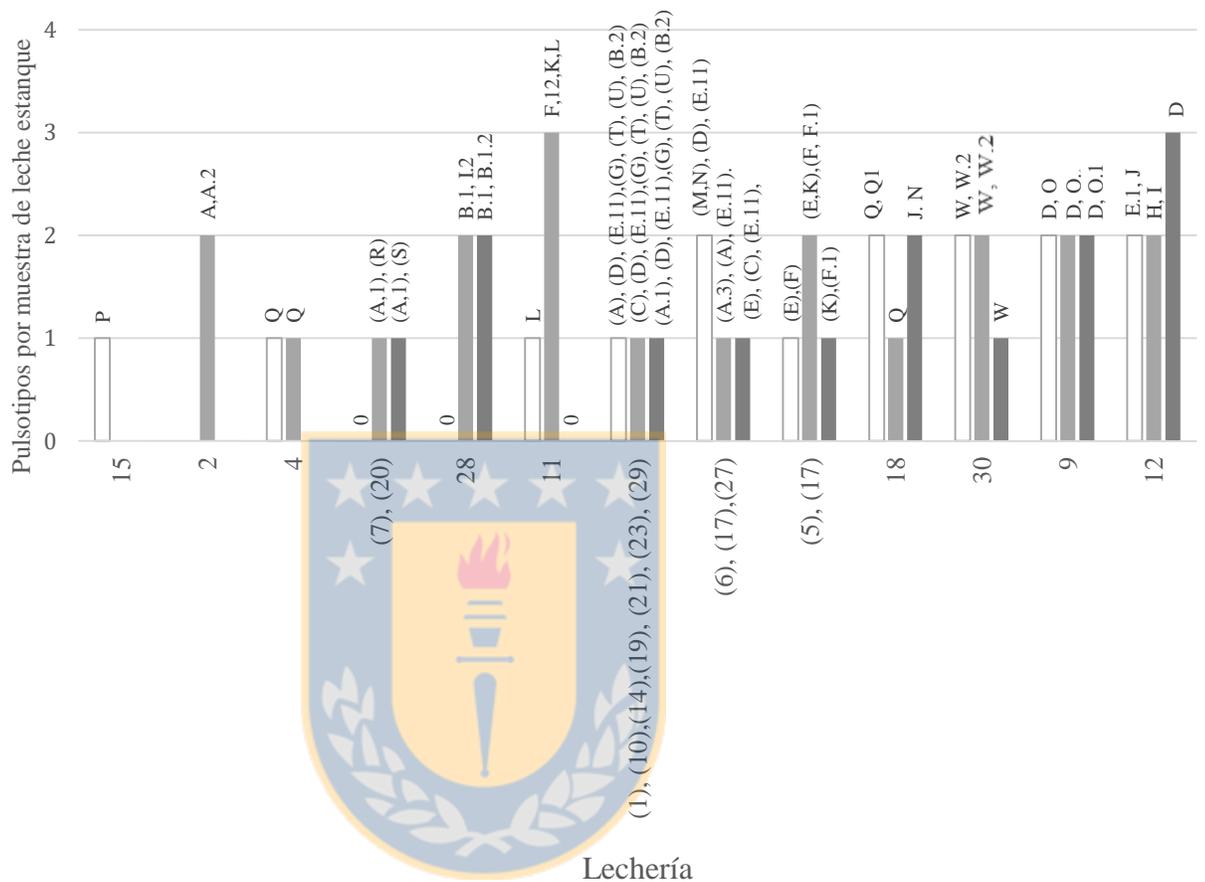


**Figura 2.2. Dendrograma con pulsotipos de *S. aureus* identificados desde muestras de leche y superficies con adherencia macroscópicas de la región de Ñuble.** 1: Pulsotipo identificado por visual, 2: Leche de estanque; 3: superficie en contacto con leche con adherencia macroscópica). Fuente: Elaboración Propia.



**Figura 2.3. Mapa referencial de distribución de pulsotipos de *S. aureus* identificados en más de una lechería en comunas de la región de Ñuble.** Etiquetas de pulsotipos en rojo (B.1, D, E, J, K, N, Q) corresponden a pulsotipos distribuidos en comunas diferentes; etiquetas de cepas en verde (A, A1) corresponden a pulsotipos distribuidos dentro de una misma comuna; áreas rectangulares en azul corresponden a operación lechera con más de un pulsotipo distribuido entre operaciones lecheras. Fuente: Elaboración Propia.





**Figura. 2.4. Patrón de pulsotipos de *S. aureus* identificados en 3 muestras de leche de estanco consecutivas en 23 de lecherías de la región de Ñuble.** Muestra leche 1: barra blanca; Muestra 2: barra plomo clara; y Muestra 3; plomo oscuro. Fuente: Elaboración Propia.

(26,1%), 2 (8.6%) y 1 (4,3%) lecherías, respectivamente. En 18 lecherías (78.2%) el mismo pulsotipo de *S. aureus* fue identificado en al menos 2 muestras de BTM provenientes de diferentes ordeñas (**Tabla 2.1**).

***Pulsotipos de S. aureus en adherencias macroscópicas de superficies en contacto con leche***

De las 8 lecherías en las que se identificaron aislados de *S. aureus* desde AMES, en 7 de ellas se observó clonalidad entre pulsotipos presentes en AMES y BTM (**Tabla 2.2**). Dentro de éstas 7 lecherías, en 5 de ellas (ID#: 2, 10, 16, 19 y 30) se identificó un pulsotipo único dentro de las muestras evaluadas, ó pulsotipos estrechamente relacionados. En las lecherías 1 y 12 se identificó clonalidad entre los pulsotipos identificados en BTM y AMES; como también se identificaron pulsotipos presentes sólo en AMES. En las lechería 12 (SID=0.82), todos los pulsotipos identificados en las muestras de leche de estanque fueron también aislados desde AMES. Particularmente en la granja 12, los pulsotipos E y K identificados en AMES no se identificaron en leche de estanque de ésta lechería; sin embargo, fueron aislados en BTM de las lecherías 5, 6 y 11. La lechería 1 (SID=0.8), el pulsotipo C se identificado tanto en la jarra de leche como en 2 muestras de leche de estanque. Sin embargo, el pulsotipo D, aislado desde manguera de leche mastítica, no se identificó desde BTM. Por otro lado, el pulsotipo P2 fue identificado únicamente en la adherencia de la tapa de jarra de la lechería en esa muestra y lechería.

**Tabla 2.2. Lecherías con distribución clonal de pulsotipos de *Staphylococcus aureus* en adherencias macroscópicas en superficies en contacto con leche y leche de estanque de Chile.**

Lechería	Pulsotipos por lechería	Pulsotipo con distribución clonal	Muestras	
			BTM <sup>1</sup>	AMES <sup>2</sup>
1	A, A.1, C, D.	C	2/3	Jarra de Leche
2	A, A.2	A	1/3	Manguera para desviar leche mastítica
10	D	D	3/3	Colector, tubo largo de leche, tarro de leche.
12	E, E.1, H, I, J, K, K.1, K.2.	H	1/3	Pezonera (TI, DD), Tarro de leche (n=1),
		I	1/3	Pezoneras (DI), Tarro de leche (n=1), Manguera Larga de Leche.
		J	2/3	Pezoneras (TD, DI), Tubo corto de leche (DD), Tubo largo de leche, Tarro de leche (n=2), Estanque (Salida externa e interna, y aspa).
		E.1	2/3	Válvula del Colector
		K.1	1/3	Salida externa del estanque
16	B, B.1	B	3/3	Línea de leche 2.5m
		B.1	1/3	Línea de leche 0.6 m
19	G	G	3/3	Tarro de leche (n=2)
30	W.W2	W	3/3	Colector

<sup>1</sup> BTM: leche de estanque; AMES<sup>2</sup> Adherencias macroscópicas en superficies en contacto con leche. Fuente: Elaboración Propia.

## DISCUSIÓN

### ***Diversidad de pulsotipos de S. aureus dentro de lecherías de la región de Ñuble***

La diversidad de los patrones de distribución de pulsotipos en las muestras de BTM dentro de las lecherías fue variable; identificándose desde homogéneo (SID=0) a heterogéneo (SID=1). La principal fuente reconocida de *S. aureus* en los rebaños lecheros es la glándula mamaria infectada que elimina este patógeno a través de la leche secretada (Sears *et. al*; 1990), y en los cursos subclínicos se acopia en la BTM durante el ordeño. Considerando este antecedente, una fuente de origen probable de los pulsotipos de *S. aureus* identificados de manera consistente en las muestras de BTM de nuestro estudio, podría corresponder a pulsotipos de origen intramamarios. A este respecto, en una investigación complementaria, pero externa a los objetivos planteados en nuestro estudio, Latorre *et. al* (2020) evaluó en la granja ID#12 la relación genética de los pulsotipos identificados en las muestras de BTM, AMES (incluidos en nuestro estudio) y aislados de leche de IMI animales de esta lechería (Latorre *et. al*, 2020). Los resultados de ésta evaluación indican clonalidad entre los pulsotipos de *S. aureus* identificados en animales, superficies y leche de estanque (**Anexo 3**). Más aún, los mismos clones han sido identificados en muestras de animales en años diferentes. Por lo anterior, un posible origen de los pulsotipos presentes en BTM y AMES podría corresponder a la glándula mamaria infectada, si bien la direccionalidad de la contaminación no es posible de determinar (Latorre *et. al*, 2020).

Por otro lado, las fuentes extramamarias de *S. aureus* también representan un potencial origen de los pulsotipos de *S. aureus* presentes en la leche de estanque.

Diversas fuentes extramamarias han sido evaluadas como una potencial fuente de *S. aureus* como causante de IMI en el rebaño (Zadoks *et. al*, 2002; Haveri *et. al*, 2008; Latorre *et. al*, 2020). Sin embargo, el análisis de cepas de *S. aureus* presentes en adherencias y/o biopelículas en superficies en contacto con leche y su rol como potenciales fuentes de orígenes de las cepas de leche de estanque, no ha sido descrito previo a la investigación de nuestro equipo (Latorre *et. al*, 2020). Al identificar en nuestro estudio que 87.5% de las lecherías con AMES-*S. aureus*<sup>(+)</sup> presentó clonalidad entre los pulsotipos de *S. aureus* presentes en AMES y leche de estanque, se reafirma el rol potencial de las adherencias y/o biopelículas como fuente de origen de pulsotipos en leche de estanque. Además, en el caso particular de la lechería 12, la investigación de Latorre *et. al* (2020) confirmó que las superficies de adherencias macroscópicas presentes en pezonera, válvula del colector, manguera de leche, y tubo corto de leche *S. aureus*<sup>(+)</sup> corresponden a biopelículas (**Anexo 4.1 y 4.2**). En las biopelículas visualizadas en cada muestra evaluada por Latorre, se identificaron bacterias cocáceas compatibles en tamaño, morfología y crecimiento a *S. aureus*. La granja 12 en particular, fue en la que el mayor número de muestras AMES-*S. aureus*<sup>(+)</sup> y todos los pulsotipos identificados en estas muestras, a excepción del pulsotipo K, fueron identificados en muestras de leche de estanque. Estos resultados resaltan la importancia del proceso de higiene para la correcta eliminación de residuos de leche en superficies. La leche tiene nutrientes importantes para el crecimiento bacteriano y por lo tanto, las deficiencias durante el proceso de limpieza pueden permitir que residuos de leche permanezcan en las superficies del equipo. La presencia de bacterias con capacidad para formar

biopelículas, la presencia de residuos de leche y el tiempo transcurrido entre ordeños pueden proporcionar un ambiente propicio para la formación de adherencias y/o biopelículas en estas superficies (Alonso y Kabuki, 2019; Latorre *et. al.*, 2009, 2010, 2020). Durante la formación de la biopelícula, la última etapa descrita es la dispersión de la célula bacteriana al ambiente; lo que puede coincidir con eliminación de estas bacterias a leche de estanque (Latorre, *et al.*, 2010; Moormeier y Bayles, 2017). La presencia de biopelículas en superficies en contacto con la leche, es importante no tan sólo para *S. aureus*, sino también para otros microorganismos patógenos con habilidad de formar biopelículas y de importancia en salud pública como por ejemplo *L. monocytogenes* (Latorre *et. al.*, 2010). De todo esto se desprende que el proceso de limpieza e higiene del equipo de ordeño debe considerar todos los parámetros necesarios para asegurar la eliminación de remanentes de leche y bacterias presentes en el equipo posterior a la ordeña. El lavado de equipo robotizado se ha implementado en las lecherías de todo el mundo; sin embargo en la región de Ñuble, Chile, las lecherías de tamaño pequeño a mediano como las incluidas en nuestro estudio en su mayoría realiza el procedimiento de limpieza e higienización del equipo con fallas en su implementación (Latorre; datos no publicados). Por anterior, las biopelículas presentes en el equipo de ordeño potencialmente pueden albergar microorganismos de importancia en salud pública presentes en el ambiente de la operación lechera e identificados previamente en la BTM tales *E. coli* Shiga-toxina positivas, *E. coli* O157H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Yersinia enterocolitica* (Jayarao *et. al.*, 2001; Latorre *et. al.*, 2010).

Por otro lado, la presencia de pulsotipos de *S. aureus* genéticamente relacionados, podría significar una evolución temporal de los pulsotipos dentro de la lechería. Esta evolución ha sido descrita previamente desde lecherías; como también en ambientes hospitalarios en humanos por (O'Brien *et. al*, 1999; Zadoks *et. al*, 2000).

### ***Diversidad de pulsotipos de S. aureus entre de lecherías de la región de Ñuble***

Una alta heterogeneidad de pulsotipos de *S. aureus* fue identificado en nuestro estudio entre muestras de leche de estanque de lecherías de la Región de Ñuble, lo que es consistente con resultados descritos anteriormente evaluando una única muestra de leche de 62 lecherías de las provincias de Biobío y Ñuble (Pacha *et. al* 2015).

En nuestro resultados se identificó la distribución de 9 pulsotipos de *S. aureus* entre operaciones lecheras distintas, donde 7 de ellas se encontraban distribuidas en comunas geográficamente distantes como por ejemplo es el caso de la cepas B.1 distribuidas entre las comunas de San Carlos y Bulnes (40 Km distancia aproximado). La distribución de éstos pulsotipos entre operaciones lecheras no relacionadas podrían indicar que la existencia de una fuente común que actúe como vehículo en la diseminación de estas cepas. Considerando la dinámica de movimiento de una producción lechera bovina, la propagación de los pulsotipos de *S. aureus* podría atribuirse entre otras al movimiento de microorganismos a través de fómites o vectores que interactúen entre lecherías. A éste respecto podemos considerar por ejemplo animales que ingresan y salen de una lechería a otra,

insectos, ropa de personal (médicos veterinarios, asesores), personal (ordeñadores, médicos veterinarios) y camiones de leche, entre otros.

El movimiento animal entre recintos animales ha sido reconocido como un peligro importante para la propagación de patógenos de mastitis contagiosa, lo que aumenta la importancia de evaluar el ganado antes de que se incorpore al rebaño (Wells, 2000). Durante el desarrollo de nuestra investigación, entre el periodo de 2014 a 2016, lecherías incluidas en este estudio cerraron sus instalaciones vendiendo sus animales a otras lecherías lecheras. Esto podría contribuir a una potencial propagación de cepas de *S. aureus* entre las lecherías. A nuestro conocimiento, no se ha evaluado la dinámica de distribución de cepas en rebaños lecheros al ingresar animales infectados. Sin embargo, Voelk *et. al* (2014) describió la presencia de cepas de *S. aureus* genotipo B en rebaños libres posterior a compartir el equipo de ordeña con rebaños *S. aureus* genotipo B positivos.

Por otro lado, superficies abióticas pueden comportarse como fómites y contribuir a la propagación de *S. aureus*. La epidemiología molecular ha descrito una distribución clonal de *L. monocytogenes* entre heces de los animales, zapatos y guantes almacenados en casas de trabajadores rurales, sugiriendo una causalidad de distribución desde sitio de trabajo hacia el hogar de sus trabajadores (Kersting *et. al.*, 2009). A pesar que la dinámica de *S. aureus* entre superficies abióticas como vestimenta del personal de lechería no se ha investigado, en hospitales humanos se ha descrito la distribución de clones de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) entre servicios no relacionados (ej. Cirugía y pediatría), y su presencia en calzado y ropa de personal hospitalario (Kanwar *et. al.*, 2019). Por lo anterior, el personal de trabajo interconectado entre lecherías,

como por ejemplo el Médico Veterinario, conductor del camión de la leche, y sus respectivas vestimentas, y vehículos puede representar un potencial medio de propagación de microorganismos entre lecherías.

Nuestra principal hipótesis considera que los pulsotipos distribuidos entre lecherías, e inclusive dentro de muestras positivas dentro de lecherías, se atribuyan a una potencial causalidad epidemiológica. No obstante, es importante no excluir el concepto de cepas con diseminación universal. Estos pulsotipos diseminados universalmente se encuentran distribuidos entre ambientes de manera ubicua y sin tener una asociación epidemiológica, lo que podría representar un confusor en nuestros resultados. La presencia de pulsotipos con distribución universal ha sido descritas para especies como *L. monocytogenes* (Zadoks y Schukken, 2006; Moura *et. al.*, 2016). Al considerar la amplia diversidad identificada de pulsotipos de *S. aureus* entre lecherías, estos pulsotipos universales, representarían una proporción del total de pulsotipos identificados.

En producción lechera un gran número de publicaciones de *S. aureus* se vincula a la epidemiología de *S. aureus* de origen intramamario entre y dentro de lecherías (Capurro *et al*, 2010; Ruegg *et al.*, 2017). Por lo anterior, publicaciones previas vinculando el rol de las superficies del equipo de ordeño con las cepas causantes de IMI han sido reportadas previamente (Zadoks *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2008). La diversidad de *S. aureus* entre y dentro de lecherías de muestras de superficies en contacto con la leche vinculadas con su identificación en leche de estanque ha sido escasamente reportado (Lee *et. al*, 2012; Latorre *et. al*, 2020). Lee *et. al* (2012) evaluó la presencia de pulsotipos de *S. aureus* en leche mastítica, superficies interna de pezonera, utensilios, y BTM de 10 lecherías de baja producción lechera

en Brasil. Los resultados de Lee *et. al* (2012) identificaron una baja frecuencia de muestras de BTM positivos a *S. aureus* y, dónde 2 de los 12 clusters de pulsotipos encontrados se aislaron simultáneamente en superficies y BTM. Cabe destacar que es complejo contrastar directamente los resultados de Lee *et. al* (2012) considerando que los criterios de nuestra investigación difieren en que el criterio de clasificación de los pulsotipos (exigencia de similitud de un 80%). Al considerar en nuestros análisis el criterio de Tenover, nuestros análisis consideran una mayor exigencia en la designación de pulsotipos. Por otro lado, el criterio de selección de muestras no considera las adherencias; que planteamos podría representar una fuente constante que microorganismos viables al estar presente en las superficies en contacto con leche. Por lo anterior, contrastar los resultados anteriormente presentados con los reportados por otros grupos de investigación es limitado por la escasa literatura disponible; o los diferentes criterios utilizados en el análisis.

La técnica de digestión enzimática y PFGE se ha utilizado para la vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos Pulsenet del centro de enfermedades de los Estados Unidos (CDC) para diversos microorganismos, incluyendo *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *E. coli* O157H7, entre otros. (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocols.html>); como también se describió el protocolo de identificación de MRSA. En nuestro estudio se realizó la subtipificación usando la digestión enzimática del ADN bacteriano con una única enzima *SmaI* acorde con el protocolo descrito por el CDC. No obstante, la sensibilidad de la detección de microorganismos genéticamente relacionados por PFGE es posible de aumentar cuando el ADN el mismo aislado es restringido por más de una enzima en protocolos diferentes

(Latorre *et. al.*, 2009). Al aumentar el poder de discriminación, la capacidad de clasificar 2 pulsotipos diferentes como diferentes aumenta; aumentando la sensibilidad de la técnica. Al considerar nuestros resultados, el poder de discriminación de la técnica utilizando sólo una enzima de restricción fue suficiente al evaluar la diversidad de cepas entre las lecherías analizadas. Sin embargo, el aumentar la discriminación de los pulsotipos previamente clasificados como clones, podría aumentar al complementar el análisis con otra enzima. La técnica de PFGE se ha sido descrita como la técnica estándar de oro para comparar genomas bacterianos durante muchos años por el CDC, comparando genomas bacterianos utilizando el patrón de bandas de 15 a 30 bandas de ADN. No obstante, con el desarrollo y validación de nuevas técnicas moleculares como la secuenciación masiva de genomas completos, a partir del 2019 Pulsenet (CDC), ha comenzado a remplazar el diagnóstico de relación epidemiológica de brotes en enfermedades transmitidas por los alimentos de PFGE a secuenciación masiva. La técnica de PFGE permitió identificar, con buen potencial de discriminación, las cepas identificadas en la presente investigación, por lo que puede significar una importante técnica de evaluación de diversidad de poblaciones bacterianas de *S. aureus* en leche de estanque y superficie.

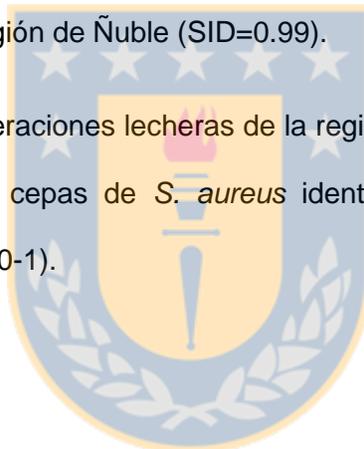
Pese a que nuestros resultados indican que entre lecherías de la región de Ñuble una amplia diversidad de *S. aureus* se encuentran distribuidos, la diversidad dentro de cada lechería varió describiéndose de clonal, estrechamente relacionada, a heterogénea con pulsotipos no relacionados genéticamente. Más allá, pulsotipos de *S. aureus* distribuidos entre lecherías diferentes presentaron diferentes dinámicas dentro de las operaciones lecheras. La clonalidad entre cepas de *S.*

*aureus* presentes en adherencias/biopelículas y muestras de leche de estanque representa un potencial reservorio de este microorganismo al recuento bacteriano de estanque. Los resultados del presente capítulo refuerzan la importancia de reconocer la dinámica e identificar posibles reservorios de éste patógeno intramamario y potencial patógeno humano en la producción lechera.



## CONCLUSIONES

1. Existe una alta diversidad de cepas de *S. aureus* presentes entre las operaciones lecheras de la región de Ñuble (SID=0.99).
2. Dentro de las operaciones lecheras de la región de Ñuble existe variabilidad en la diversidad de cepas de *S. aureus* identificadas en leche de estanque y superficies (SID=0-1).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F.M., H.C. Wegener, and V.T. Rosdahl. 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary Microbiology* 45:139–150. doi:10.1016/0378-1135(95)00043-A.
- Adwan, K.. 2013. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia microbiológica*: 1-4.
- Alonso, V.P.P., and D.Y. Kabuki. 2019. Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *International Journal of Dairy Technology* 72:472–478. doi:10.1111/1471-0307.12587.
- Antonios, Z., P. Theofilos, M. Ioannis, S. Georgios, V. Georgios, B. Evridiki, E. Loukia, M. Kyriaki, A. Athanasios, and L. Vasiliki. 2015. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk from Greek traditional ovine farms. *Small Ruminant Research* 125:120–126. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.02.009.
- Anderson, J. C. 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis [UK]. *British Veterinary Journal*.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H. and 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.

- 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.
- Biberstein, E. L., Jang, S. S., and Hirsh, D. C. 1984. Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *Journal of clinical microbiology* 19(5), 610-615.
- Blowey and Edmonson. 2010. *Mastitis Control in Dairy Herds*. (2nd 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.
- Capurro, A., Concha, C., Nilsson, L., and Ostensson, K. 1998. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica* 40(4): 315-321.
- Capurro, A., A. Aspán, H. Ericsson Unnerstad, K. Persson Waller, and K. Artursson. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal of Dairy Science* 93:180–191. doi:10.3168/jds.2009-2471.
- 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, ANFilho, LM Ferreira and 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.

Gil, R., Silva, F. J., Peretó, J., & Moya, A. (2004). Determination of the core of a minimal bacterial gene set. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68(3), 518-537.

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.

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.

Hamza, D. A., Dorgham, S. M., & Arafa, A. (2015). Coagulase Gene Typing with Emphasis on Methicillin-Resistance Staphylococci: Emergence to Public Health. Advances in Infectious Diseases, 5(04), 196.

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.

- 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.
- Kanwar, A., M. Thakur, M. Wazzan, S. Satyavada, J.L. Cadnum, A.L. Jencson, and C.J. Donskey. 2019. Clothing and shoes of personnel as potential vectors for transfer of health care–associated pathogens to the community. *American Journal of Infection Control* 47:577–579. doi:10.1016/j.ajic.2019.01.028.
- Kersting, A.L., L.C. Medeiros, and J.T. LeJeune. 2009. Differences in *Listeria monocytogenes* Contamination of Rural Ohio Residences With and Without Livestock. *Foodborne Pathogens and Disease* 7:57–62. doi:10.1089/fpd.2009.0318.
- Lange, C. C., Brito, M. A., Reis, D. R., Machado, M. A., Guimarães, A. S., Azevedo, A. L., and Meurer, I. R. 2015. Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary microbiology*, 176(3), 382-388.
- Larsen, H. D., Aarestrup, F. M., and Jensen, N. E. 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.

Latorre, A.A., J.A.S. Van Kessel, J.S. Karns, M.J. Zurakowski, A.K. Pradhan, R.N. Zadoks, K.J. Boor, and Y.H. Schukken. 2009. Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a Reservoir in Milking Equipment on a Dairy Farm. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1315–1323. doi:10.1128/AEM.01826-08.

Latorre, A.A., J.S. Van Kessel, J.S. Karns, M.J. Zurakowski, A.K. Pradhan, K.J. Boor, B.M. Jayarao, B.A. Houser, C.S. Daugherty, and Y.H. 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* 93:2792–2802. doi:10.3168/jds.2009-2717.

Latorre, A.A., J.A.S.V. Kessel, J.S. Karns, M.J. Zurakowski, A.K. Pradhan, K.J. Boor, E. Adolph, S. Sukhnanand, and Y.H. Schukken. 2011. Increased In Vitro Adherence and On-Farm Persistence of Predominant and Persistent *Listeria monocytogenes* Strains in the Milking System. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3676–3684. doi:10.1128/AEM.02441-10.

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.

Latorre, A.A., P.A. Pachá, G. González-Rocha, I. San Martín, M. Quezada-Aguiluz, A. Aguayo-Reyes, H. Bello-Toledo, R. Oliva, A. Estay, J. Pugin, and M.A. Muñoz. 2020. On-Farm Surfaces in Contact with Milk: The Role of *Staphylococcus*

*aureus*-Containing Biofilms for Udder Health and Milk Quality. Foodborne Pathogens and Disease. doi:10.1089/fpd.2019.2704.

Lee, S.H.I., C.H. Camargo, J.L. Gonçalves, A.G. Cruz, B.T. Sartori, M.B. Machado, and C.A.F. Oliveira. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science* 95:7377–7383. doi:10.3168/jds.2012-5733.

Lwanga and Lemeshow. 1991. Sample size determination in health studies – A Practical Manual. World Health Organization, Geneva. Switzerland.

Maslow, J., M. Mulligan, and R. Arbeit. 1993. Molecular Epidemiology: the application of contemporary techniques to typing bacteria. *Clinical infectious diseases* 17: 153-162.

Moormeier, D.E., and K.W. Bayles. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology* 104:365–376. doi:10.1111/mmi.13634.

Munoz, M. and R. Zadoks. 2007. Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90(3): 1220–1224.

O'Brien, F.G., J.W. Pearman, M. Gracey, T.V. Riley, and W.B. Grubb. 1999. Community Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involved in a Hospital Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 37:2858–2862.

- 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. *PloSone* 7(10) e47671. 26.
- 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. 4thEd. National Mastitis Council, Verona WI, United States. Pp: 1-12.
- Phillips, W. E., & Kloos, W. E. 1981. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 14(6), 671-673.
- Pacha, P. 2015. 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. Master Thesis. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Riley, L.W. 2004. Molecular epidemiology of infectious diseases. Washington, DC. Estados Unidos.
- 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.
- Roberson, JR, L Fox, DD Hancock, CC Gay. 1998. Coagulase-positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77: 958-969.

- Ruegg, P.L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science* 100:10381–10397. doi:10.3168/jds.2017-13023.
- 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.
- Shopsin, B., M. Gomez, S. O. Montgomery, D. H. Smith, M. Waddington, D. E Dodge, D. A. Bost, M. Riehman, S. Naidich and N. Kreiswirth. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3556-3563.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Taponen, S., Supré, K., Piessens, V., Van Coillie, E., De Vliegher, S., & Koort, J. M. (2012). *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62(1): 61-65.
- Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239.
- Van Slyke, T., F. Nunes.Braga, D. Nydan, R. Zadoks, J. Huntley and Y. Shukken. 2008. Bulk tank surveillance program for New York Dairies. National Mastitis Council Annual Proceedings. New Orleans, United States.
- Voelk, V., H.U. Graber, B.H.P. van den Borne, C. Sartori, A. Steiner, M. Bodmer, and M.C. Haerdi-Landerer. 2014. A longitudinal study investigating the prevalence of *Staphylococcus aureus* genotype B in seasonally communal dairy herds. *J. Dairy Sci.* 97:4184–4192. doi:10.3168/jds.2013-7291.

Wells, S.J. 2000. Biosecurity on Dairy Operations: Hazards and Risks. *Journal of Dairy Science* 83:2380–2386. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75127-7.

Werkman, C. H. (1930). An improved technic for the Voges-Proskauer test. *Journal of bacteriology*, 20(2), 121.

Zadoks, R.N., J.R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm, and Y.H. Schukken. 2011. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:357–372. doi:10.1007/s10911-011-9236-y.

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., H.F. Schulte and L. Tokofsky. 2005. Molecular tools enhance the value of bulk tank milk. NMC Annual meeting proceedings. Pp:86-93.

Zadoks, R. and Y. Schukken. 2006. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet clin Food Anim* 22: 229-261.

Zadoks, R. 2007. Species identification of CNS: genotypic as the gold standard. Heifer Mastitis Conference, Ghent, Belgium. Pp. 25.894-3902.

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.



## CAPÍTULO 3

### IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE FACTORES DE VIRULENCIA PRESENTES EN AISLADOS DE *S. aureus* DE OPERACIONES LECHERAS DE LA REGIÓN DE ÑUBLE

Pacha, P.A., M.A. Munoz, E. Paredes-Osses, and A.A. Latorre. 2020. Short communication: Virulence profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk and adherences on milking equipment on Chilean dairy farms. *Journal of Dairy Science* 103:4732–4737. doi:10.3168/jds.2019-17794. **(Anexo 6)**

#### INTRODUCCION

Una gran variabilidad de cepas de *S. aureus* han sido identificadas entre y dentro de operaciones lecheras de diferentes zonas del mundo (Joo *et al.*, 2001; Jayarao *et al.*, 2004; Capurro *et al.*, 2010; Pacha, 2015) identificándose que algunas de estas son las responsables de las IMI dentro del rebaño y otras pertenecen a cepas presentes en el ambiente (Zadoks *et al.*, 2011). Diferencias entre estas cepas (IMI vs ambientales) son atribuibles a factores que le permiten ingresar, sobrevivir y multiplicarse dentro de la glándula mamaria. Los factores de virulencia son componentes estructurales o factores extracelulares que permiten la adhesión, establecimiento y multiplicación de un determinado microorganismo causando una enfermedad (Sutra and Poutrel, 1994). *Staphylococcus aureus* es una bacteria que presenta una amplia diversidad de cepas con significativa variación en sus patrones de factores de virulencia, estructurales y enzimáticos (Fuello, 2005). En las diferentes patologías asociadas con *S. aureus*, se describe la interacción variable de alrededor de 40 factores de virulencia dentro de los

que se incluyen toxinas extracelulares, enzimas y proteínas de superficie (Arvidson and Tegmark, 2001). De esta forma, se describe que no existe un factor de virulencia predominante que sea responsable por sí sólo, de la patogénesis de *S. aureus*, a excepción de enterotoxinas estafilocócicas, SE, y toxinas del síndrome del Shock tóxico, TSST-1 específicas de *S. aureus* (Arvidson and Tegmark, 2001). Sin embargo, algunos factores de virulencia pueden ser más importantes que otros dependiendo de la etapa de la patogenia (Fitzgerald *et. al*, 2000). La expresión de los factores de virulencia varía entre cepas y fases de crecimiento bacteriano; de esta forma se describe que factores de adhesión a proteínas del hospedador (i.e. fibronectina, fibrinógeno, colágeno, etc.), son expresados durante la etapa de crecimiento exponencial, y que posterior a esta, se expresan los factores secretores relacionadas con resistencia a la fagocitosis y diseminación de la infección (i.e. coagulasa, leucocidinas, etc.) (Ziebandt *et. al*, 2004).

### **Patobiología de *S. aureus* en una IMI**

La patobiología clásica de una IMI se inicia con el ingreso de *S. aureus* por el orificio del pezón a la glándula mamaria de forma ascendente típicamente, durante la rutina de ordeño. En la ordeña, el esfínter del pezón se abre y tapón de queratina es removido de la punta del pezón, lo que facilita el ingreso de microorganismos que ha colonizado el piel de la punta pezón, a la glándula (Sutra and Poultrrel, 1994; Blowey and Edmonson, 2010). Adicionalmente, el aumento en la presión intramamaria permite el paso de microorganismos presentes en la punta del pezón al interior de la glándula mamaria. Una vez que *S. aureus* ha ingresado al interior de la glándula mamaria, debe ocurrir la adhesión de la bacteria al tejido mamario (lumen alveolar, conducto lactífero, epitelio glandular epitelial) (Kerro-Dego *et al.*, 2002). La adhesión bacteria-célula puede ocurrir de forma específica a través de ligandos celulares o receptores de superficie, o de forma

inespecífica a través de uniones físico-químicas (Kerro-Dego *et al.*, 2002). La adhesión bacteria-célula de *S. aureus* sucede a través de proteínas que son componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz conocidas como las MSCRAMMs (*m*icrobial *s*urface *c*omponents *r*ecognizing *a*dhesive *m*atrix *m*olecules) que permiten la unión al hospedador (Sutra and Poutrel, 1994; Foster and Höök, 1998). En la superficie de las células epiteliales mamarias, se encuentran glicoconjugados (proteoglicanos, glicoproteínas y glicolípidos). Dentro de las glicoproteínas de adhesión presentes en la matriz celular se describen, la fibronectina, el colágeno, la laminina, la elastina, vitronectina y el fibrinógeno. Adicionalmente, en la medida que exista epitelio dañado, las proteínas de la matriz celular están expuestas. La adhesina A de fibronectina (*fnbA*) se encuentra descrita dentro de los factores de virulencia de importancia en cepas de *S. aureus* de IMI subclínicas (Khoramian *et al.*, 2015). La adhesina A de fibronectina (*fnbA*) es una proteína de la coagulación dependiente de fibrinógeno que media la adhesión bacteriana a superficies con fibrinógeno (Mcdevitt *et al.*, 1997).

Durante la colonización de la glándula mamaria por *S. aureus*, ocurre la expresión de factores antifagocíticos; tales como la cápsula y la proteína A de *S. aureus*. La proteína A es una proteína polimórfica considerada como uno de los factores de virulencia más importantes en la invasión de *S. aureus* (Zecconi *et al.*, 2006). La proteína A es codificada por el gen *spa* y posee 3 dominios en la célula bacteriana: intracelular, de transmembrana y unido a la pared celular. La porción de la proteína A ubicada en la superficie bacteriana se une a la porción FC de la inmunoglobulina IgG (principalmente IgG<sub>2</sub>) y factor de Von Willenbranet; inhibiendo así, el reconocimiento por el sistema inmune (Sutra and Poutrel, 1994). El polimorfismo del gen *spa* ha sido identificado en la gran mayoría de las cepas de *S. aureus* asociadas a IMI bovinas, siendo utilizado para

la subtipificación de éstas (Zecconi *et al.*, 2006; Bar-Gal *et al.*, 2015). Se ha identificado que el *S. aureus* posee mecanismos de evasión de fagocitosis; ingresando al interior de células fagocíticas, como también la invasión y replicación de *S. aureus* en el interior de células epiteliales *in vitro* (Almeida *et al.*, 1996; Hebert *et al.*, 2000; Blowey and Edmonson, 2010).

Una gran mayoría de *S. aureus* asociadas a IMI poseen una capa exopolisacárida que ayuda a la adherencia y colonización en la glándula mamaria (Aguilar *et al.*, 2001). Fox *et al.* (2005) describe que cepas de *S. aureus* causantes de IMI *in vitro* poseen una mayor habilidad de formadora de biopelículas al ser comparadas con cepas de *S. aureus* ambientales. Se han identificado genes que permiten la formación *in vitro* de la capa de exopolisacáridos o *slime layer*. El operón *ica* (adhesión intercelular) codifica el polisacárido de adhesina intercelular (PIA) que permite la agregación entre células bacteriana y formación de una biopelícula asociada a PIA (Crampton *et al.*, 1999; Vasudevan *et al.*, 2002; Khoramian *et al.*, 2015). El operón *ica* está compuesto por los genes *ica A, B, C* y *D*. El PIA está compuesto por uniones  $\beta$ -1,6 de glicosamina y sus síntesis es realizada por la enzima *N*-acetilglucosaminil transferasa; codificada a partir de *icaA*. La coexpresión de *icaA* e *icaD* se describe son de importancia para la expresión fenotípica de la cápsula polisacárida y formación de biopelícula. Durante el transcurso de una IMI por *S. aureus*, éste puede ser eliminado de forma intermitente a través de la leche (Sears *et al.*, 1990). Este hecho puede generar repercusiones en la higiene del equipo de ordeño y eventualmente mermar la calidad microbiológica de la leche. Fallas en la limpieza o diseño del equipo de ordeño (problemas de ángulo de inclinación) permiten mantener restos de leche y microorganismos en contacto con estas superficies durante periodos inter-ordeños; generando el espacio para que microorganismos con

habilidad formadora de biopelículas como *S. aureus* puedan establecerse y asociarse estrechamente a estas superficies. De esta forma, la presencia de biopelículas en equipos de ordeño podría convertirse en una fuente de microorganismos que al ser arrastrados de forma mecánica durante cada ordeño finalizan en la leche de estanque e incrementan potencialmente los valores de unidades formadoras de colonias (Latorre *et al.*, 2010; Latorre *et al.*, 2011).

### **Factores de virulencia de impacto en salud pública.**

**Enterotoxinas estafilocócicas.** La leche es un alimento utilizado como materia prima para consumo directo (crudo) de una proporción de la población humana o es acopiada como materia prima para la elaboración de otros productos. Adicionalmente, la leche es un medio nutritivo ideal para el crecimiento y desarrollo bacteriano. Pese que en algunos lugares, como en ciertos estados de los Estados Unidos, es legalmente permitido el consumo de leche cruda (<http://www.realrawmilkfacts.com/raw-milk-regulations>), la pasteurización de leche cruda es norma como requisito para su consumo humano. En Chile, el artículo 200 del Reglamento Sanitario de los Alimentos DT 77/966 menciona que “la pasteurización de la leche es obligatoria en aquellas localidades en que el Presidente de la República lo haya así decretado, de acuerdo a la Ley N° 4869 del 4 de Agosto de 1930, como asimismo la de los productos derivados de ella”. Pese a lo anterior, reportes preliminares de consumo de leche cruda identificaron que 6 de 9 (66,6%) operaciones lecheras de la provincia de Ñuble poseen al menos un trabajador que consume rutinariamente leche cruda (Latorre and Muñoz, 2013). En la provincia de Ñuble se describe que 19 (50%) de operaciones lecheras son positivas al menos a un genotipo de *S. aureus* en muestras leche de estanque de diferentes lecherías (Pacha, 2015). La presencia de cepas heterogéneas permite plantear si estas cepas de *S. aureus*

presentes en le leche de estanque (independiente de su origen IMI o ambiental), poseen en su genotipo, la potencialidad de producir enfermedades de impacto en salud pública. Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) son una heterogénea familia de proteínas clasificadas en 7 serotipos enterotoxigénicos diferentes: A, B, C1, C2 C3, D, E (Bequer *et al.*, 1997). Las SE son toxinas termoestables que se comportan como superantígenos al estimular inespecíficamente los linfocitos T (Balaban and Rasooli, 2000). El cuadro de intoxicación por toxinas estafilocócicas suele presentarse entre 1 a 6 horas de consumido el alimento; sin embargo la presentación aguda de los síntomas puede suceder a los 30 minutos posterior al consumo del alimento. En Chile la identificación de toxinas estafilocócicas (SE) es realizado por el Instituto de Salud pública (ISP) desde cepas recolectadas por Secretarías Regionales de Ministerio (SEREMI) de Salud. Este análisis se basa en la detección mediante serología de las SE: A, B, C y D. Durante el periodo de enero del 2011 a diciembre del 2014, el ISP identifico 570 cepas de *S. aureus* aisladas desde muestras de alimentos de diferente naturaleza distribuidas en frecuencias anuales de 100 a 182 cepas. De estas cepas, entre el 16% y 42% resultaron positivas a la presencia de enterotoxinas estafilocócicas principalmente SE A y B (Instituto de Salud Pública, 2015a). Pese que este reporte indique un bajo número de cepas aislado quesos, permite reportar que existe un número no menor de cepas de *S. aureus* con potencialidad genética para generar cuadros enterotoxigénicos en la población. Considerando que el consumo de leche cruda, pese a ser una práctica poco documentada, es una realidad entre las lecherías de la región de Ñuble; es importante considerar que existe un potencial riesgo, entre otros patógenos, de consumir leche o productos lácteos elaborados con leche no pasteurizada con presencia de toxinas estafilocócicas (u otros riesgos microbiológicos).

### ***Resistencia a Meticilina.***

La facultad de establecer mecanismos de resistencia antibiótica ha sido ampliamente descrita para *S. aureus*, luego de que éste fuera capaz de generar resistencia a la penicilina luego de unos años de su uso clínico durante los años 40. De esta forma, cepas de *S. aureus* fueron capaces de sintetizar  $\beta$ -lactamasas que inactivaban la acción de la penicilina. A partir de este hecho, un grupo de  $\beta$ -lactámicos semi-sintéticos han sido desarrollados dentro de los que se describe la meticilina; cuyo principio activo resistente a la acción de las  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo; en 1960 a un año de instaurado este antibiótico en su uso clínico en Inglaterra, los primeros casos de resistencia a meticilina fueron descritos en las infecciones intra-hospitalarias (Barber, 1960). En un comienzo, la presencia de *Staphylococcus aureus meticilino resistente* (MRSA; *methicillin resistant S. aureus*) fue descrita inicialmente de manera restrictiva a casos intrahospitalarios. No obstante, a partir de los años 90 comenzaron a describirse la presencia de MRSA en casos de pacientes no involucrados con recientes hechos intrahospitalarios y en Chile en 2008 (Noriega *et. al*, 2008). De esta forma, las cepas de MRSA fueron subdivididas en dos grandes grupos: MRSA aisladas y asociadas a casos intrahospitalarios (*hospital associates, HA-MRSA*) y MRSA aisladas desde comunidad (*Community-acquired; CA-MRSA*). Donde los MRSA de origen hospitalario se describe poseen resistencia a otras familias a antibacterianos; presentando multiresistencia. Los mecanismo de resistencia a la meticilina de *S. aureus* se describe que se puede producir por tres mecanismos: i) hiperproducción de  $\beta$ lactamasas, ii) modificación en la estructura de una de las 4 proteínas ligadora a penicilina (PBPs; *penicilin binding proteins*) presentes en la membrana citoplasmática de *S. aureus*, y iii) presencia de una proteína ligadora de penicilina adquirida denominada PBP2a (Palavecino, 2007). Las cepas de

MRSA poseen la capacidad de codificar la enzima PBP2a que posee una baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Esta proteína está codificada por el gen *mecA* que está contenido en el elemento genético móvil *SCCmec* (Cassette cromosómico estafilocócico *mec*), en las que el complejo de genes *mec* y del complejo *SCCmec* y regiones *j* determinan los subtipos de un cassette cromosomal. A la fecha se han descrito 11 cassettes cromosomales estafilocócicos que codifican la resistencia a meticilina (Aguayo *et. al*, 2018). Al evaluar la presencia del gen *mecA* aislados de *S. aureus* identificados desde leche de estanque se lecherías del Estado de Minnesota en los Estados Unidos, 2 de 50 (4%) de las lecherías resultaron positivas a *mecA* (Haran *et al.*, 2012). Por otro lado, en Corea durante los años 1997 al 2004, se identificaron prevalencias anuales de aislados de *S. aureus mecA* positivos que variaron entre un 0 al 8.7 % (Moon *et al.*, 2007). En Chile el Instituto de Salud Pública (ISP), es el encargado del programa de vigilancia de fenotipo SARM comunitario que incluye la confirmación de los genes *mecA* y *pvl* (toxina de Pantón-Valentine) y tipificación por macrorestricción, por polimorfismo de proteína Spa y tipificación por multilocus (*Multilocus strain typing*, MLST) (Instituto Salud Pública, 2013; <http://www.ispch.cl/content/19540>). Durante los años 2007-2012, se reportaron en la región del Biobío, un total de 7 aislados de MRSA identificados desde sistemas de atención público. Durante los años 2013 y 2014, se identificaron un total de 60 aislados de MRSA en la región del Biobío, figurando en 3<sup>er</sup> lugar dentro de las regiones del país. Sin embargo, este último reporte incluye sólo las provincias de Concepción (n=53) y del Biobío (n=7) (Instituto de Salud pública; 2015b). De esta forma la condición MRSA en la región del Ñuble es desconocida; más aún ligada al ámbito rural y leche cruda.

El gen *mecC* otorga resistencia a meticilina y se encuentra principalmente ligado al ámbito veterinario y animal, al ser identificado el año 2011 en la población bovina en el Reino Unido (García-Álvarez *et. al*, 2011). El gen *mecC* es homólogo al gen *mecA* en un 70% y la proteína codificada tiene un 63% de homología con PBP2a. En la detección fenotípica de MRSA dada por *mecC*, la detección por sensibilidad por método en disco en sensidiscos de cloxacilina, ha descrito un número importante de falsos negativos. En Chile, a nuestro conocimiento escasamente se ha evaluado la presencia de resistencia a meticilina *mecA* y no se ha evaluado la presencia de *mecC* en explotaciones veterinarias. Por lo anterior, en el presente capítulo se evaluará la presencia de los genes importancia en patogenia de IMI y de salud pública ligada a toxinas y resistencia antimicrobiana en aislados de *S. aureus* identificados en las explotaciones de la región de Ñuble, Chile.





## HIPÓTESIS

Cepas de *S. aureus* aislados desde muestras de leche de estanque y superficies de equipo de ordeña de operaciones lecheras de la región de Ñuble poseen factores de virulencia de importancia en la patogenicidad de IMI, formación de biopelículas en superficies y de importancia en Salud Pública.

## OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la presencia de factores de virulencia de importancia en IMI y salud pública en cepas de *S. aureus* identificadas desde leche de estanque y adherencias macroscópicas en equipo de ordeño de operaciones lecheras de la región de Ñuble.

Objetivos específicos.

1. Caracterizar cepas de *S. aureus* aisladas desde muestras de leche de estanque y superficies del equipo de ordeño de la región de Ñuble de acuerdo a la presencia de factores de virulencia de importancia en IMI *coa*, *nuc*, *fnbA*, *ica A* e *icaD*.
2. Caracterizar cepas de *S. aureus* aisladas desde muestras de leche de estanque y superficies del equipo de ordeño de la región de Ñuble de acuerdo a la presencia de factores de virulencia de importancia en salud pública *mecA*, *mecC*, *sea* y *seb*.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Caracterización de aislados de *S. aureus*.** Las cepas de *S. aureus* a analizadas corresponden a los 166 aislados de *S. aureus* previamente subtipificados en el capítulo 2 de 23 operaciones lecheras de las Región de Ñuble.

**Extracción de ADN.** El ADN utilizado para la identificación de los genes de virulencia, corresponde al ADN utilizado para confirmar especie de *S. aureus* descrito en el capítulo 2. La extracción de ADN fue realizada según el método de Adwan (2013) modificado. Los aislados fueron cultivados en placas de agar sangre con esculina en condiciones aeróbicas por 24 horas. Finalizado el periodo de incubación, se inocularon 10 µl de colonias en 5 mL de caldo cerebro corazón a 37°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 centrifugó (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 PureTMDestilledWatrer, Invitrogen) y se llevó a 100°C por 10 min en baño seco (AccuBlockTM, Digital Dry Bath). Finalmente, se centrifugo la suspensión a 13000G por 5 min y se recolectaron 70 µL del sobrenadante en un nuevo eppendorf para ser almacenados a -20°C para su posterior análisis.

**Análisis de Genes de Virulencia.** Los genes de virulencia analizados incluyeron fibronectina A (*fnbA*); proteína de adhesión intercelular A (*icaA*) and D (*icaD*); enterotoxina A (*sea*) y enterotoxina B (*seb*); genes de meticilina resistencia (*mecA* y *mecC*) y marcadores de virulencia como coagulasa (*coa*) y termonucleasa (*nuc*). Cada partidor utilizado fue acorde a las condiciones de termociclado indicadas por los autores

correspondientes e indicados en las **Tablas 3.1 y 3.2** (Murakami *et. al.*, 1991; Vasudevan *et. al.*, 2003; Vancraeynest *et. al.*, 2004; Cremonesi *et. al.*, 2005; Srinivasan *et. al.*, 2006; Paterson *et. al.*, 2012). Los segmentos amplificados por PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa de 1,5% con un 1% de GelRed® (Biotium, Hayward, CA) por 50 min en Buffer TBE 0,5X a 105V. Posteriormente, los fragmentos fueron visualizados mediante UV transluminator (BioDoc-It® ImagingSystem, Benchtop, Reino Unido).

**Controles de genes de virulencia.** En cada ensayo se incluyó un control negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228 y agua ultrapura) y control positivo respectivo para cada gen. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fue utilizado como control positivo de los genes: *icaA*, *icaD*, *fnbA*, *coa*, y *nuc*. Mientras que para los genes codificadores de las enterotoxinas A y B, se utilizaron los controles de referencias proporcionados por el Instituto de Salud Pública de Chile. Para los controles de genes de resistencia antibiótico se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 y *S. aureus mecALGA251* para la detección de los genes *mecA* y *mecC* respectivamente. Cada aislado fue considerado como positivo cuando el amplicon de la muestra y el control positivo correspondiente coincidían en su tamaño y fueran acordes con el tamaño esperado.

**Análisis estadístico.** Los resultados de los perfiles de factores de virulencia de las cepas de *S. aureus* fueron analizados utilizando métodos de estadística descriptiva. Se describió la frecuencia de los factores de virulencia en grupo de proporción de cepas de estanque vs superficies de acuerdo a su perfil de factores de virulencia. Diferencias entre grupo de cepas presentes en leche o superficie de acuerdo a la presencia de factores de virulencia evaluadas utilizando la prueba de *Chi* cuadrado o Fisher exact con un intervalo de confianza de un 95%.

**Tabla 3.1. Factores de virulencia de importancia en la patogénesis de *S. aureus* en IMI y oligonucleótidos a utilizar en la caracterización de cepas aisladas de operaciones lecheras de la región de Ñuble.** Fuente: Elaboración Propia.

Factor de virulencia	Gen	Amplicon Pb	Oligonucleotido	Secuencia oligonucleotida (5´-3´)	Condiciones de ciclado	Referencia
Adhesina A para fibronectina	<i>fnb A</i>	127	<i>fnbA-F</i>	CACAACCAGC AAATATAG	30 ciclos :	Vancraynest <i>et. al.</i> , 2004.
			<i>fnbA-R</i>	CTGTGTGGTAATCATGTC	94.8°C a 45 s, 50.8° a 45s. 72.8°C a 1 min,	
Adhesina polisacarida intercelular	<i>ica</i>	1315	<i>ica A</i>	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	30 ciclos:	Vasudevan <i>et al.</i> , 2003. Castelani <i>et al.</i> , 2015.
		381	<i>ica D</i>	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	95°C por 20 s; 55°C por 1min; 72°C por 1 min.	
Coagulasa	<i>coa</i>	400	<i>coa F</i>	CCG CTT CAA CTT CAG CCT AC	30 ciclos:	Cremonesi <i>et al.</i> , 2005.
			<i>coa R</i>	TTA GGT GCT ACA GGG GCA AT	94 °C por 1 min 56 °C por 1 min,	
Termonucleasa	<i>nuc</i>	204	<i>nuc F</i> <i>nuc R</i>	AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT	68 °C por 1 min,	

**Tabla 3.2. Factores de virulencia de *S. aureus* de importancia en salud pública y oligonucleótidos a utilizar en la caracterización de cepas aisladas desde operaciones lecheras de la región de Ñuble.** Fuente: Elaboración Propia.

Factores de virulencia	Gen	Amplicón (pb)	Oligonucleotido	Secuencia oligonucleotida (5'-3')	Condiciones de ciclado	Referencia
Toxina estafilocococica A	<i>sea</i>	180	<i>Sea F</i>	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	30 ciclos: 94 °C por 1 min 56 °C for 1 min, 68 °C for 1 min	Cremonesi <i>et al.</i> , 2005.
			<i>Sea R</i>	CATCGAAACCAGCCAAAGTT		
Toxina estafilocococica B	<i>seb</i>	405	<i>Seb F</i>	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	30 ciclos: 94°C por 30 s; 55°C por 30 s 72°C por 30 s.	Srinivasan <i>et al.</i> , 2006.
			<i>Seb R</i>	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
Gen de Resistencia a meticilina	<i>mecA</i>	533	<i>mecA F</i>	ATGACGATGAGGATAGCG	94°C por 30 seg; 55°C por 30 s 72°C por 30 s.	Babra <i>et. al.</i> , 2013. ; Murakami <i>et al.</i> , 1991.
			<i>mecA R</i>	CTCGGATAACACCTGTTGC		
	<i>mecC</i>	188	<i>mecALGA251 F</i>	CATTAAAATCAGAGCGAGGC		Paterson <i>et al.</i> , 2012.
			<i>mecALGA251 R</i>	TGGCTGAACCCATTTTTGAT		

## RESULTADOS

### ***Frecuencias de genes y perfiles de virulencia de virulencia***

Todos los aislados y pulsotipos de *S. aureus* resultaron positivos para los genes *coa*, *nuc*, y *fnbA*; mientras que los genes *mecA*, *mecC*, y *seb* no fueron detectados (**Tabla 3.3**). Un total de 5 perfiles de virulencia (**PV**) fueron identificados entre los aislados evaluados (**Tabla 3.4**), siendo el perfil *nuc*(+) *coa*(+) *fnbA*(+) *icaA*(+) *icaD*(+) *mecA*(-) *mecC*(-) *sea*(-) *seb*(-), denominado VP1, el más frecuente identificado en 90 (79.6%) y 41 (77.4%) de las muestras de BTM y AMES, respectivamente. Este perfil fue identificado en 21 de las 23 lecherías positivas a *S. aureus*, y distribuido en 7 de las 8 lecherías positivas a *S. aureus* en AMES (**Tabla 3.5**).

El PV *nuc*(+) *coa*(+) *fnbA*(+) *icaA*(-) *icaD*(+) *mecA*(-) *mecC*(-) *sea*(-) *seb*(-) fue el segundo PV (denominado, PV2) con mayor frecuencia de identificación (15.9% y 20.8% para BTM y AMES, respectivamente). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre la fuente de identificación de aislado, BTM ó AMES, y la frecuencia del perfil de virulencia de *S. aureus* identificado ( $p \leq 0.05$ ) (**Tabla 3.4**).

El tercer perfil más frecuente *coa* (+) *nuc*(+) *fnbA*(+) *seb*(-) *mecA*(-) y *mecC*(-) *icaA*(+) *icaD*(+) *sea*(+) (PV3) que se caracteriza por ser positivo al gen de la enterotoxina A; se identificó en 3 aislados de la granja 11, correspondiente a 2 muestras de leche de estanque positivas. Al cruzar el perfil de virulencia con el pulsotipo identificado en el capítulo 2 los 3 aislados corresponden a los pulsotipos K y L (Figura 3.1). El pulsotipo L identificado únicamente en esta lechería 11 fue aislado en 2 de las 3 muestras de leche de estanque recolectadas. El pulsotipo K identificado en las lecherías 5, 11 y 12; poseía el gen *sea* únicamente en la lechería 11.

**Tabla 3.3. Aislados de *Staphylococcus aureus* positivos a factores de virulencia de importancia en adhesión a superficie y salud pública.** Fuente: Elaboración Propia.

	Aislados de <i>S. aureus</i>						Valor de P <sup>1</sup>
	BTM		AMES		Total		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Implicancia en patogénesis</b>							
<i>icaA</i>	90	79.62	41	77.4	135	81.3	0.839
<i>icaD</i>	111	98.2	52	98.1	163	98.2	1
<i>fnbA</i>	113	100.0	53	100.0	166	100.0	1
<i>Coa</i>	113	100.0	53	100.0	166	100.0	1
<i>Nuc</i>	113	100.0	53	100.0	166	100.0	1
<b>Implicancia en Salud Pública</b>							
<i>Sea</i>	3	1.8	0	0.0	3	1.2	0.552
<i>Seb</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1
<i>mecA</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1
<i>mecC</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1

Valor de P<sup>1</sup> diferencia entre aislados de origen de leche de estanque y adherencias macroscópicas calculadas por Chi-cuadrado o Fisher Exact.

**Tabla 3.4. Perfil de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados desde leche de estanque (BTM) y adherencias macroscópicas en el equipo de ordeño (AMES).**

Fuente: Pacha *et al.*, 2020.

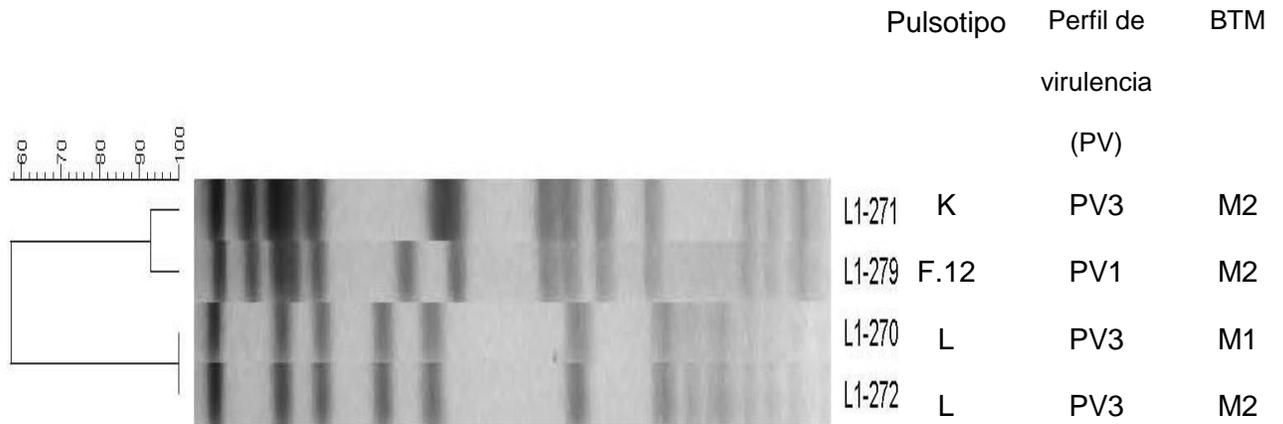
Perfil de Virulencia (VP) <sup>1</sup>	BTM (n=113)			AMES (n=53)		Total (n=166)		P-valor <sup>2</sup>		
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>Sea</i>	n	%	n	%			
	n	%	n	%	n	%				
PV1	+	+	-	90	79,6	41	77,4	131	78,9	0,74
PV2	-	+	-	18	15,9	11	20,8	29	17,5	0,58
PV3	+	+	+	3	2,7	0	0,0	3	1,8	0,45
PV4	-	-	-	1	0,9	1	1,9	2	1,2	1
PV5	+	-	-	1	0,9	0	0,0	1	0,6	0,55

<sup>1</sup> Aislados con perfil *coa*<sup>(+)</sup> *nuc*<sup>(+)</sup> *fnbA*<sup>(+)</sup> *seb*<sup>(-)</sup> *mecA*<sup>(-)</sup> and *mecC*<sup>(-)</sup>, <sup>2</sup> Diferencias entre BTM y AMES calculado por Chi-cuadrado o Prueba de Fisher Exacto ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.5. Perfiles de virulencia (PV) de *Staphylococcus aureus* aislados desde leche de estanque (BTM) y adherencias macroscópicas del equipo de ordeño (AMES) en lecherías de la región de Ñuble. Fuente: Pacha *et al.*, 2020.**

Lechería #ID	Perfil de Virulencia <sup>1</sup>	Frecuencia de Perfil de Virulencia %	Fuentes de <i>S. aureus</i> <sup>2</sup>		
			AMES CPP	AMES CL	BTM
1	PV1/ PV2/ PV4	37.5 /50/12.5	ND	+ / + / +	+ / + / -
2	PV1	100	ND	+	+
4	PV1	100	ND	ND	+
5	PV1	100	ND	ND	+
6	PV1/PV2	83.3 / 16.7	ND	ND	+
7	PV1	100	ND	ND	+
9	PV1/ PV2/ PV4	33.3 / 50 /16.6	ND	ND	+ / + / +
10	PV1/ PV2	60 / 40	ND	+ / +	+ / +
11	PV2/ PV3	25 / 75	ND	ND	+ / +
12	PV1/ PV2	91.7 / 8.3	+ / -	+ / +	+ / +
14	PV1	100	ND	ND	+
15	PV2	100	ND	ND	+
16	PV1/PV2	38.4 / 61.5	ND	+ / +	+ / +
17	PV1	100	ND	ND	+
18	PV1	100	ND	ND	+
19	PV1	100	ND	+	+
20	PV1/PV2	20.0 / 80.0	ND	ND	+ / +
21	PV1	100	ND	ND	+
23	PV1	100	ND	ND	+
27	PV1	100	ND	ND	+
28	PV1/ PV5	85.7/14.3	ND	+/-	+/+
29	PV1	100	ND	ND	+
30	PV1	100	ND	+	+

<sup>1</sup> Todos los aislados son *coa*<sup>(+)</sup> *nuc*<sup>(+)</sup> *fnbA*<sup>(+)</sup> *seb*<sup>(-)</sup> *mecA*<sup>(-)</sup> y *mecC*<sup>(-)</sup>. PV1: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV2: *icaA*<sup>(-)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV3: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(+)</sup>; PV4: *icaA*<sup>(-)</sup> *icaD*<sup>(-)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV5: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(-)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>. <sup>2</sup> Fuente de identificación de *S. aureus*: <sup>3</sup> AMES CPP= Adherencias/biopelículas en equipo de ordeño en contacto con la punta del pezón (pezonera); AMES CL= Adherencias/biopelículas en equipo de ordeño en superficies en contacto con leche (colector de leche, válvula del colector, tubo corto de leche, tubo largo de leche, salida de leche estanque, aspa de estanque, tarro de leche, jarra de leche, manguera de leche utilizada para desviar leche mastítica ó con tratamiento antibiótico, y línea de leche; BTM= Leche de estanque; ND= No detectado.



**Figura 3.1. Dendrograma de pulsotipos de *S. aureus* identificados en lechería#11 positiva para cepas positivas para el gen de enterotoxina estafilocócica A. BTM: muestra de leche de estanque. <sup>1</sup> PV1: *coa*(<sup>+</sup>) *nuc*(<sup>+</sup>) *fnbA*(<sup>+</sup>) *seb*(<sup>-</sup>) *mecA*(<sup>-</sup>) y *mecC*(<sup>-</sup>); *icaA*(<sup>+</sup>) *icaD*(<sup>+</sup>) *sea*(<sup>-</sup>); PV3: *coa*(<sup>+</sup>) *nuc*(<sup>+</sup>) *fnbA*(<sup>+</sup>) *seb*(<sup>-</sup>) *mecA*(<sup>-</sup>) y *mecC*(<sup>-</sup>) *icaA*(<sup>+</sup>) *icaD*(<sup>+</sup>) *sea*(<sup>+</sup>). Fuente: Elaboración Propia.**

Cabe destacar que para confirmar que los amplicones presentes en cada producto de PCR coinciden con la secuencia del gen de enterotoxina A, los productos fueron secuenciados en la Universidad Austral de Chile, comparados entre sí y posteriormente comparados con secuencias de *sea* presentes en data blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados complementarios confirmaron la misma secuencia en los 2 pulsotipos *sea*-positivos correspondiente al gen *sea* (GAGACGCCTAATGATTACAATTAGTACCATGTTGCAGTTTGGTTTATTCCTTATTG CATTGATAGGTCTAGTAATCAAGCTTATTGAATTAAGCAATAAAAA).

***Pulsotipos y perfiles de virulencia de S. aureus.*** Al comparar los perfiles de virulencia con los pulsotipos de *S. aureus* identificados en el capítulo 2, los 6 pulsotipos (B, B.1, D, E, J y O.1) presentaron 2 perfiles de virulencia en los genes de virulencia evaluados

(**Tabla 3.6**). Considerando cada pulsotipo y su respectivo perfil de virulencia de los 42 pulsotipos identificados por PFGE, las cepas totales identificadas corresponden a 53 cepas de *S. aureus*.



**Tabla 3.6. Pulsotipos de *S. aureus* con más de un perfil de virulencia identificados desde muestras de leche de estanque y adherencias macroscópicas del equipo de ordeño (AMES) en lecherías de la región de Ñuble. Fuente: Elaboración Propia.**

Pulsotipo	Lechería	Perfil de Virulencia	Leche Estanque	AMES
B	16	PV1	M1,M2,M3	Línea de leche 2.5m
		PV2	M2, M3	Línea de leche 2.5m
B.1	16	PV1	M1	ND
		PV2	ND	Línea de leche 60 cm
	28	PV1	M3	ND
D	1	PV2	ND	Manguera de leche mastítica.
		PV2	ND	Manguera de leche mastítica.
	9	PV1	M1	ND
		PV2	M2, M3	ND
	10	PV1	ND	Colector, entrada de tarro, manguera de leche.
		PV2	ND	Colector, entrada de tarro, manguera de leche.
E	5	PV1	M1, M2	ND
	6	PV1	M3	ND
		PV2	M3	ND
	12	PV2	ND	Entrada de tarro.
E.1	12	PV1	VC	Válvula del colector
		PV2	M1	ND
J	12	PV1	M3	Pezonera, tubo corto pezonera, aspa de estanque, manguera de leche mastítica, salida interna de estanque.
		PV2	M1	ND
	18	PV1	M3	ND
O.1	9	PV2	M1	ND
	9	PV4	M2	ND

<sup>1</sup> Todos los aislados son *coa*<sup>(+)</sup> *nuc*<sup>(+)</sup> *fnbA*<sup>(+)</sup> *seb*<sup>(-)</sup> *mecA*<sup>(-)</sup> and *mecC*<sup>(-)</sup>. PV1: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV2: *icaA*<sup>(-)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV4: *icaA*<sup>(-)</sup> *icaD*<sup>(-)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>. ND: no detectado.

## DISCUSION

### ***Factores De Virulencia De Importancia En Infecciones Intramamarias***

Los resultados de los genes de coagulasa y termonucleasa son consistentes con las características fenotípicas de *S. aureus*, por los cuales son las pruebas bioquímicas tales como las nucleasa y termonucleasa, ó la presencia de genes de aislados putativos comúnmente utilizados para la identificación de especie (Cremonesi *et. al.*, 2005; Grispoli *et. al.*, 2019). El gen de fibronectina A fue altamente conservado entre los aislados de BTM y AMES identificados en el presente estudio (100%). Diversas frecuencias del gen *fnbA* se han descrito para aislados de *S. aureus* de orígenes distintos incluyendo un 43% de leche de infecciones intramamarias, 28% de piel del pezón, 21,4% en BTM y 0.8% en humanos (Haveri *et. al.*, 2008; da Costa *et. al.*, 2014; Khoramian *et. al.*, 2015). Fibronectin A ha sido descrito como una importante proteína involucrada en la adhesión de *S. aureus* a fibronectina, elastina y fibrinógeno (Deogo *et. al.*, 2002). Más allá, la internalización de *S. aureus* a células epiteliales de bovino y humanos ha sido descrita ser mediada por fibronectina A (Jett and Gilmore, 2002; Pereyra *et. al.*, 2016). Por lo anterior, la presencia de *S. aureus-fnbA(+)* en AMES, específicamente, en piezas del equipo de ordeño en estrecho contacto con el pezón (tal como lo son las pezoneras o válvulas del colector) podrían predisponer a un aumento en el riesgo de estas infecciones intramamarias pues los aislados *S. aureus fnbA(+)* presentarían una mayor ventaja de unión durante la etapa de adhesión en la patogénesis de la IMI.

La mayoría de los estudios que evalúan los genes de *icaA* e *icaD* se basan en *S. aureus* aislados desde muestras de leche de mastitis clínica o subclínica, con resultados diversos en frecuencias que oscilaron entre 87% y 100% (Vasudevan *et. al.*, 2003;

Castelani *et. al.*, 2015; Khoramian *et. al.*, 2015; Pereyra *et. al.*, 2016). Sin embargo, a nuestro conocimiento, no hay informes previos sobre *icaA* e *icaD* disponibles para *S. aureus* identificados desde AMES y solo unos pocos han sido descritos para aislados de origen en BTM; principalmente para MRSA (Kreausukon *et. al.*, 2012; Prenafeta *et. al.* 2014). A pesar de eso, la frecuencia de ambos genes (78.9%) entre nuestros aislados analizados pueden ser más bajos que los reportados en otros estudios, la presencia de estos genes podría representar un mecanismo importante para la adhesión a superficies bióticas o abióticas, tales como superficies de equipos de ordeño. Es de destacar que sobre un tercio de nuestros aislamientos se obtuvieron de adherencias / biopelículas en equipos de ordeño, que también podría ser responsables de la contaminación BTM debido a *S. aureus* desprendido de estas películas (Latorre *et. al.*, 2020). En consecuencia, los hallazgos en nuestro estudio pueden estar sesgados hacia la presencia de *S. aureus* con mayores capacidades de adherencia tanto en equipo como en BTM. Después de la adhesión a la superficie, la adhesina intercelular de polisacárido (PIA), que está codificado por el operón de adhesión intercelular *icaABCD*, puede secretarse alrededor de *S. aureus* (de Souza da Cunha, 2014). El PIA acumulado juega un papel clave en la acumulación de las células y en el desarrollo de biopelículas, lo que no solo contribuye la persistencia de patógenos en operaciones lecheras (Latorre *et. al.*, 2011), sino que también confiere una protección física de las bacterias contra el sistema inmunitario, los antimicrobianos y desinfectantes que comúnmente se usan en los operaciones lecheras. En un estudio complementario Latorre *et. al.* (2020) confirmó por microscopia de escaneo que en los AMES existían biopelículas en piezas del equipo de ordeño (Latorre y Muñoz 2015; Latorre *et. al.*, 2020). Pese a que este análisis por SEM no pudo ser realizado en todas las muestras, las propiedades físicas macroscópicas en

aquellas piezas que no fueron evaluadas microscópicamente, eran consistentes con las piezas positivas a la presencia de biopelículas. Por lo tanto, nuestros resultados resaltan la importancia de investigar nuevas fuentes de *S. aureus* como adherencias o biopelículas en el equipo de ordeño, dado que son fuentes potenciales para el desarrollo de infecciones en animales y seres humanos debido al contacto de partes y piezas del equipo contaminados, con las puntas de los pezones y manos de los operarios.

### ***Factores De Virulencia De Importancia En Salud Pública***

En nuestro estudio, los factores de virulencia de *S. aureus* de importancia para la salud pública, como ser la resistencia a los antimicrobianos y producción de enterotoxinas, no se detectaron o sólo se observaron con baja frecuencia. Sólo 3 aislados de *S. aureus* (1.8%), y 2 cepas (2/44) de origen en BTM y de sólo una operación lechera, fueron positivas a enterotoxina A. Nuestro estudio muestra la presencia de cepas de *S. aureus* positivas a enterotoxinas, pero no relacionadas genéticamente, lo que puede atribuirse a una transferencia horizontal del gen *sea* (Zeaki *et. al*, 2015). Esto podría ser una de las razones por la cual el pulstipo K posea el gen *sea* en la granja 11, pero no en otras 2 lecherías de la región. Para el gen codificador de la enterotoxina A, se ha descrito la transferencia horizontal por profagos del mismo gen *sea* secuenciado e identificados en los pulstipos de nuestro estudio (Zeaki *et. al*, 2015). Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) son proteínas que pueden causar enfermedades entéricas y síntomas eméticos a las personas que consumen alimentos contaminados con cantidades suficientes de SE, incluidos los productos lácteos (Johler *et. al.*, 2018; Necedová *et. al.*, 2019). Incluso, a pesar que no se recomienda el consumo de leche cruda debido al alto riesgo de la presencia de patógenos transmitidos por los alimentos (Oliver *et. al.*, 2005), esta sigue siendo una práctica bastante común en la población rural de Chile, en particular en las

lecherías de la Región de Ñuble (Latorre y Muñoz, 2013). Cabe destacar que los tres *S. aureus* positivos sea se recuperaron de 2 de las tres muestras de BTM en una sola granja, lo que representa un grave riesgo para la salud humana, ya que los trabajadores agrícolas han informado sobre el consumo de leche cruda en esta lechería (Latorre y Muñoz, datos no publicados). Incluso, aun cuando la leche sea pasteurizada, se ha descrito que SE es una proteína termoresistente y que permanece detectable después del tratamiento a temperaturas mayores a 92 °C (Necidová *et. al.*, 2019). Por lo tanto, la vigilancia de SE es crucial para mejorar la seguridad de los productos lácteos y proteger la salud del consumidor (Miao *et. al.*, 2017).

La resistencia a los antimicrobianos es una problemática emergente de gran importancia para la salud humana y animal. A nuestro conocimiento, éste estudio es el primer informe de evaluación tanto de *mecA* como de *mecC* en *S. aureus* aislados en leche de estanque y equipos de ordeño en lecherías chilenas. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios realizados en alimentos en Chile (específicamente, en el suministro de carne de cerdo), en los que también se ha descrito la ausencia de ambos genes, *mecC* y *mecA* entre los aislados de *S. aureus* (Velasco *et. al.*, 2018). Sin embargo, los genes de resistencia a la meticilina *mecA* y *mecC* han sido previamente detectados en aislados de cepas de *S. aureus* humanos y veterinarios como se describe en otros estudios realizados en países europeos y Australia (Worthing *et. al.*, 2016, Lakhundi y Zhang, 2018). En contraste con nuestros resultados negativos en los genes de resistencia antimicrobianos a meticilina, en Chile la presencia de SAMR es considerada cada vez más frecuente en los hospitales humanos de Chile, describiéndose hasta un 51% de susceptibilidad a cloxacilina.

Aunque el presente estudio muestra los hallazgos obtenidos en un número limitado de lecherías de una sola región de Chile, la diversidad de lecherías incluidas en el estudio puede estar relacionada con muchas operaciones lácteas en Chile, así como también lecherías de diferentes partes del mundo. Además, a pesar de que sólo una proporción seleccionada de los factores de virulencia descritos para *S. aureus* se analizaron en nuestro estudio, la inclusión de genes involucrados en la adherencia y la formación de biopelículas de *S. aureus* aisladas de adherencias *in situ* / biopelículas contribuyen al conocimiento actual sobre la epidemiología de *S. aureus* en la lecherías. Aún quedan varias preguntas por abordar, como el papel de la glándula mamaria infectada como una de las posibles fuentes de *S. aureus* para AMES y BTM. Sin embargo, la relación genética entre *S. aureus* de BTM, AMES e IMI recientemente han sido bien documentados en una de las 23 lecherías de nuestro estudio (Latorre *et. al.*, 2020). Al abordar la importancia emergente de evaluar las fuentes de MRSA en la producción animal y alimentaria, el presente estudio es el primero en evaluar *mecA* y *mecC* en aislamientos de *S. aureus* de las operaciones lecheras chilenas.

Perfiles de virulencia de *S. aureus* aislados de adherencias/biopelículas en superficies en contacto con leche y BTM no fueron diferentes. Los reservorios de *S. aureus*, como las biopelículas/adherencias en superficies en contacto con la leche, pueden ser fuente de invasión e infección de la glándula mamaria por organismos capaces de *S. aureus* en las operaciones lecheras.

## **CONCLUSIONES**

1. El patrón de virulencia con mayor frecuencia para las cepas de *S. aureus* fue *coa* (+) *nuc*(+) *fnbA*(+) *icaA*(+) *icaD*(+) *sea*(-) *seb*(-) *mecC*(-) *mecA*(-).
2. Los factores de virulencia de importancia en IMI de los genes *coa*, *nuc*, *fnbA*, *icaA* e *icaD* son altamente frecuentes entre *S. aureus* aislados de leche de estanque y superficie con adherencias macroscópicas identificados en lecherías de la región de Ñuble.
3. *Staphylococcus aureus* aislados desde muestras de leche de estanque y superficies del equipo de ordeño de la región de Ñuble no presentan genes *mecA*, *mecC* y *seb*.
4. Existen cepas de *S. aureus* positiva al gen de la enterotoxina A en la región de Ñuble.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adwan, K. 2013. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia microbiológica*: 1-4.
- Almeida, R.A., K.R. Matthews, E. Cifrian, A.J. Guidry, and S.P. Oliver. 1996. *Staphylococcus aureus* Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. *Journal of Dairy Science* 79:1021–1026. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76454-8.
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., M. Dominguez, and González-Rocha, G. 2018. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista chilena de infectología*, 35(1), 7-14. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>
- Aguilar, B., B. Amorena, and M. Iturralde. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 78:183–191. doi:10.1016/S0378-1135(00)00287-X.
- Arvidson, S., & Tegmark, K. (2001). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical microbiology*, 291(2), 159-170.
- Babra, C., J. G. Tiwari, , G. Pier, , T. H. Thein, , R. Sunagar, , S Sundareshan, S. ISloor, N. Hedge, S. de Wet, M Deighton, J. Gibson, P. Costantino, J. Wethrall and T. Mukkur. 2013. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia microbiologica*, 58(6): 469-474.

- Balaban, N., and Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. International journal of food microbiology, 61(1), 1-10.
- Barber, M. 1961. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol 14: 385-393.
- Bar-Gal, G.K., S.E. Blum, L. Hadas, R. Ehricht, S. Monecke, and G. Leitner. 2015. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. Veterinary Microbiology 176:143–154. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.007.
- Blowey and Edmonson. 2010. Mastitis Control in Dairy Herds. (2nd ed.). CAB international. Wallingford, UK.
- 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.
- Castelani, L., L. E. Pilon, T. Martins, C. R. Pozzi and J. R. P. Arcaro (2015). Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. Animal Science Journal, 86(3), 340-344.
- Cramton, S.E., C. Gerke, N.F. Schnell, W.W. Nichols, and F. Götz. 1999. The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. Infection and Immunity 67:5427–5433.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., and Castiglioni, B. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification

of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and cellular probes* 19(5): 299-305.

de Souza da Cunha, M. L. R. 2014. *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative Staphylococci: Virulence, Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Biosciences Institute, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Fitzgerald, J. R., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., and Smyth, C. J. 2000. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *Journal of applied microbiology* 88(6): 1028-1037.

Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology* 6(12): 484-488.

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.

García-Álvarez, L., M.T. Holden, H. Lindsay, C.R. Webb, D.F. Brown, M.D. Curran, E. Walpole, K. Brooks, D.J. Pickard, C. Teale, J. Parkhill, S.D. Bentley, G.F. Edwards, E.K. Girvan, A.M. Kearns, B. Pichon, R.L. Hill, A.R. Larsen, R.L. Skov, S.J. Peacock, D.J. Maskell, and M.A. Holmes. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine

populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 11:595–603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8.

Grispoldi, L., L. Massetti, P. Sechi, M.F. Iulietto, M. Ceccarelli, M. Karama, P.A. Popescu, F. Pandolfi, and B.T. Cenci-Goga. 2019. Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *Journal of Dairy Science* 102:1059–1065. doi:10.3168/jds.2018-15373.

Haran, K., S. Godden, D. Boxrud, S. Jawahir, J. Bender and S. Sreevatsan. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota Dairy Farms. *J. Clin. Microbiol* 50(3):688-695.

Hébert, A., K. Sayasith, S. Sénéchal, P. Dubreuil, and J. Lagacé. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett* 193:57–62. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09402.x.

Instituto de Salud Pública de Chile, 2013. Vigilancia de *Staphylococcus aureus* metilina resistente adquirido en la comunidad. Chile 2007-2012. *Boletín instituto de salud pública de Chile* 3(7):1-21.

Instituto de Salud Pública de Chile, 2015a. Vigilancia de resistencia a antimicrobianos en bacterias que pueden producir infecciones asociadas a la atención en salud. *Boletín instituto de salud pública de Chile* 5(4):1-25.

Instituto de Salud Pública de Chile, 2015b. Vigilancia de enterotoxinas en cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos, Chile 2011-2014. *Boletín instituto de salud pública de Chile* 5(1):1-17.

- 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.
- Jett, B.D., and M.S. Gilmore. 2002. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect Immun* 70:4697–4700. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4697-4700.2002>
- Johler, S., G. Macori, A. Bellio, P.L. Acutis, S. Gallina, and L. Decastelli. 2018. Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *J Dairy Sci* 101 (4): 2915-2920. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13815>
- 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.
- Kalorey, D. R., Shanmugam, Y., Kurkure, N. V., Chousalkar, K. K., & Barbuddhe, S. B. 2007. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *Journal of veterinary science* 8(2): 151-154.
- Kerro-Dego, O., Van Dijk, J. E., and Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary quarterly* 24(4): 181-198.

- Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., & Emaneini, M. 2015. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial pathogenesis* 88, 73-77.
- Kreausukon, K., A. Fetsch B. Kraushaar, K. Alt, K. Müller, V. Krömker, KH. Zessin, A. Käsbohrer, and B. A. Tenhagen. 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J Dairy Sci* 95(8): 4382-4388. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5198>
- Lakhundi, S. and Zhang, K., 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 31(4):e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- 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. A., J. A. S. Van Kessel, J. S. Karns, M. J. Zurakowski, , A. K. Pradhan, K. J. Boor, E. Adolph, S. Sukhnanand and Y. H. Schukken. 2011. Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. *Applied and environmental microbiology* 77(11): 3676-3684.

Latorre A. A. and M. A. Munoz. 2013. Assessment of on-farm raw milk consumption in Chilean dairy operations. Pages 161–162 in Natl. Mastitis Council. Annu. Meet. Proc., San Diego, CA. Natl. Mastitis Council. Inc., Verona, WI. USA.

Latorre, A.A. and M.A. Munoz. 2015. On-farm evaluation of surfaces in contact with milk during milking as a factor affecting the microbiological quality of bulk tank milk on Chilean dairy farms: A preliminary report. Pages. 231-232 in Natl. Mastitis Council. Annu. Meet. Proc., Memphis, TN. Natl. Mastitis Council. Inc., Verona, WI. USA.

Latorre, A.A., P. A. Pachá, G. González-Rocha, I. San Martín, M. Quezada-Aguiluz, A. Aguayo-Reyes, H. Bello-Toledo, R. Oliva, A. Estay, J. Pugin, and M.A. Muñoz. 2020. On farm surfaces in contact with milk: The role of *Staphylococcus aureus*-containing biofilms for udder health and milk quality. Foodborne Pathog Dis (published ahead of print, September 18th, 2019) <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2704>

Mcdevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., T. Foster and, M. Höök. 1997. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (*ClfA*) and fibrinogen. European journal of biochemistry, 247(1), 416-424.

Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. Journal of Clinical Microbiology, 38(3), 1032-1035.

- Moon, J., A. Leem, H. Kang, E. Lee, M. Kim, Y. Palk, Y. Park, Y. Joo and H. Koo. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science* 90:1176-1185.
- Miao, J., Y. Liang, L. Chen, W. Wang, J. Wang, B. Li, L. Li, D. Chen, and Z. Xu. 2017. Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. *J Food Saf* 37:e12358. <https://doi.org/10.1111/jfs.12358>
- Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., & Watanabe, S. 1991. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology* 39 (12): 1325-1330.
- Necidová, L., Bursová, Š., Haruštiaková, D., Bogdanovičová, K. and Lačanin, I., 2019. Effect of heat treatment on activity of staphylococcal enterotoxins of type A, B, and C in milk. *J. Dairy Sci.* 102:3924-3932. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15255>
- Noriega, L M, P. Gonzalez, JC Hormazabal, C Pinto, M Canals, J. M. Munita *et. al.* 2008. *Staphylococcus aureus* comunitario resistentes a Cloxacilina: comunicaci3n de los primeros 5 casos descritos en Chile. *Rev Med Chile* 136(7):886-891.
- Oliver S.P., B.M. Jayarao, and R.A. Almeida 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Path. Dis.* 2:115-129.
- Pacha, P. 2015. Evaluaci3n de la diversidad gen3tica de *S. aureus* aislados desde leche de estanque de operaciones lecheras de las provincias de Biob3o y Ñuble. Tesis

de magíster para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias. Escuela de Postgrado. Universidad de Concepción.

Palavecino, E. 2007. Clinical, Epidemiological, and Laboratory aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Pp1.-19. In Methods in molecular biology: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. Ji, Y. Ed. Human Press. Totowa, New Jersey, Estados Unidos.

Paterson, G., A. R. Larsen, A. Robb, G. E. Edwards, T. W. Pennycott, , G. Foster, D Mot, K Hermans, K BAert, SJ Peacock, J Parkhill, R. Zadoks and MA Holmes. 2012. The newly described mecA homologue, mecA LGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(12), 2809-2813.

Pereyra, E.A.L., F. Picech, M.S. Renna, C. Baravalle, C.S. Andreotti, R. Russi, L.F. Calvino, C. Diez, and B.E. Dallard. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Vet Microbiol 183:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002>

Peacock, S. J., Moore, C. E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., and Day, N. P. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity 70(9): 4987-4996.

Prenafeta, A., M. Sitjà, M.A. Holmes, and G.K. Paterson. 2014. Short communication: Biofilm production characterization of mecA and mecC methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. J Dairy Sci 329  
97:4838–4841. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7986>

Riley, L.W. 2004. Molecular epidemiology of infectious diseases. Washington, DC.  
Estados Unidos.

Srinivasan, V., A. A Sawant, B. E. Gillespie, S. J. Headrick, L. Ceasaris and S. P. Oliver.  
2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in  
*Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. Foodborne  
Pathogens & Disease, 3(3), 274-283.

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.

Vancraeynest, D., Hermans, K., & Haesebrouck, F. 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 Griethuysen, A., Van Loo, I., Van Belkum, A., Vandenbroucke-Grauls, C., Wannet,  
W., Van Keulen, P., and Kluytmans, J. 2005. Loss of the *mecA* gene during  
storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of clinical  
microbiology*, 43(3), 1361-1365.

Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. S. 2003.  
Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of  
*Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Veterinary microbiology, 92(1), 179-  
185.

- Vega F. P Alarcon, M Dominguez, H Bella, G Riedel, S Mella *et. al.* 2015. Aislamiento de *S. aureus* hetero-resistente a vancomicina en Hospital Clinica Regional de concepción, Chile. *Rev Chilena de Infectol* 32(5): 588-590.
- Velasco, V., J.L. Vergara, A.M. Bonilla, J. Muñoz, A. Mallea, D. Vallejos, M. Quezada-Aguiluz, J. Campos, and P. Rojas-García. 2018. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* strains in the pork chain supply in Chile. *Foodborne Pathog. Dis.* 15:262–268. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2381>
- Worthing, K.A., Coombs, G.W., Pang, S., Abraham, S., Saputra, S., Trott, D.J., Jordan, D., Wong, H.S., Abraham, R.J., and J.M. Norris. 2016. Isolation of mecC MRSA in Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (8), 2348–2349.352 <https://doi.org/10.1093/jac/dkw138>
- 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.
- Zecconi, A., L. Cesaris, E. Liandris, V. Daprà, and R. Piccinini. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* 40:177–183. doi:10.1016/j.micpath.2006.01.001.
- Ziebandt, A. K., Becher, D., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M., and Engelmann, S. 2004. The influence of *agr* and  $\sigma B$  in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, 4(10), 3034-3047.

## CAPÍTULO 4

### EVALUACIÓN DE LA HABILIDAD DE ADHESIÓN DE CEPAS DE *S. aureus* EN ENSAYO DE ADHERENCIA EN MICROPLACAS.

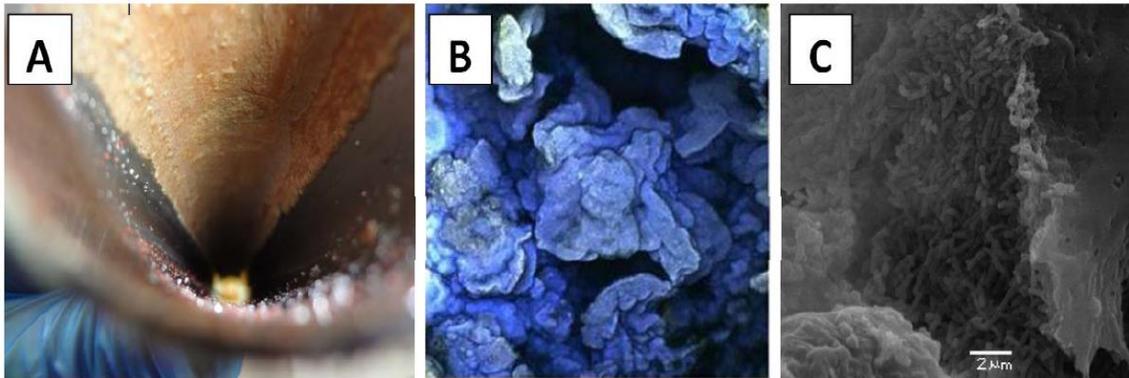
#### INTRODUCCION

Uno de los parámetros utilizados en el pago de la leche es el valor de las unidades formadoras de colonia (**UFC**) presentes en la leche de estanque. Los niveles de UFC y recuento de células somáticas (**RCS**) son utilizados como indicador de salud de la glándula mamaria e higiene de la rutina de ordeño. En Chile, las industrias procesadoras de leche bonifican el pago de acuerdo con la cantidad de UFC y RCS en niveles menores a 100.000 UFC/mL y a 400.000 cel/mL, respectivamente (<http://www.aproleche.cl/>). No obstante, estos valores, difieren con los valores de una leche obtenida de una glándula mamaria sana. De forma natural y normal la leche posee una microbiota bacteriana (Verdier-Metz *et. al*, 2012; Quigley *et. al*, 2013) y niveles de leche de estanque de UFC inferiores a 5000 UFC/mL representan un rebaño sano (Jayarao *et. al*, 2004). Un aumento en los valores de las UFC de la leche de estanque puede deberse a diferentes factores que incluyen fallas en sistema de refrigeración, microorganismos eliminados por glándulas mamarias que cursan con IMI subclínicas y, microorganismos presentes en el ambiente que durante la ordeña son arrastrados al estanque (Latorre *et. al.*, 2009, 2010, 2020). Dentro de este último grupo, se incluyen microorganismos con capacidad alta de adhesión y asociados a superficies del equipo de ordeño en la forma de biopelículas que son arrastrados con el flujo de la leche durante la ordeña (Latorre *et. al.*, 2011, 2020). Las biopelículas o están compuestas por asociaciones de microorganismos que viven en una matriz de exopolisacáridos (secretadas por ellos mismos) y agua. Estas

biopelículas pueden encontrarse adheridas a superficies inertes o tejidos vivos, representando un problema en la industria de alimentos y causa de persistencia de enfermedades, respectivamente. La matriz exopolisacárida secretada por las bacterias, posee una conformación tridimensional no compacta en la que se pueden encontrar variadas poblaciones bacterianas en ambientes con diferencias en pH y concentración de oxígeno, y que se comunican por canales donde se produce un intercambio de nutrientes entre los diferentes microorganismos presentes en la población. La matriz exopolisacárida le confiere una barrera física de protección frente a la acción de anticuerpos, sistema inmune y antibióticos (Cucarella *et. al*, 2004). Reportes acerca del rol de la presencia de biopelículas como fuente de contaminación de leche de estanque, han sido descritos para lecherías incluidas en nuestro estudio y lecherías de Nueva York (Latorre *et. al.*, 2009; 2010; 2020). En la región de Ñuble, reportes preliminares de análisis de superficies de equipo de ordeño que toman contacto con la leche ha identificado la presencia de asociaciones bacterianas visibles tanto macro como microscópicamente con características de biopelículas (Figura 4.1 extraída de Latorre and Muñoz, 2015).

### ***Mecanismos asociados a la formación de biopelículas***

La formación de una biopelícula está influenciada por diferentes factores, dentro de los que se incluyen, la habilidad de adhesión del microorganismo, las propiedades fisicoquímicas de la superficie y las condiciones ambientales. La formación de la biopelícula es un proceso dinámico que se encuentra subdividido en 5 pasos: fijación reversible, fijación irreversible, desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula, maduración y dispersión (Srey *et al.*, 2013).



**Figura 4.1. Observación macroscópica (A) y microscópica (B): TO-PRO®-3; tinción de ADN; (C): microscopía electrónica de barrido) características de una biopelícula presente en superficie de equipo de ordeño de la región de Ñuble. Fuente: Figura extraída de Latorre and Muñoz, 2015.**

Durante la formación de biopelículas, al adherirse las células bacterianas sintetizan una sustancia polimérica extracelular (*extracellular polymeric substance*, EPS) que en la etapa de fijación reversible es menor; sin embargo en la medida que EPS aumenta, la etapa de unión se vuelve irreversible (Srey *et al.*, 2013). Wilkinson *et. al* (1983) identificó cepas de *S. aureus* que estructuralmente presentaban una capa de exopolisacáridos firmemente unida y rodeando la pared bacteriana. *In vitro*, se han descrito cepas de *S. aureus* capaces de producir exopolisacáridos que pueden asociarse a superficies inertes o envolver en delgadas capas o cápsulas a células o grupos celulares (Cucarella *et. al*, 2004, Vancraeynest *et. al*, 2004). La mayoría de los *S. aureus* asociadas a IMI, expresan una capa exopolisacárida que ayuda a en la adherencia y colonización de la glándula mamaria (Aguilar *et. al.*, 2001, Fox *et. al* 2005).

En las operaciones lecheras, la etapa de fijación irreversible y la fase de dispersión podrían generar repercusiones directas en la calidad microbiológica de la leche. Durante

la etapa de fijación irreversible, la EPS presente en las bacterias se une de forma permanente a la superficie de adhesión de manera que es necesaria para su remoción la acción física o de productos químicos variando de acuerdo a la naturaleza de la biopelícula. De acuerdo a la estructura del equipo de ordeño y su limpieza, la formación de biopelículas está relacionada con un inadecuado protocolo de limpieza (Latorre, 2010). De esta forma, dichas fallas en los protocolos de limpieza pueden generar la adherencia de microorganismos organizados en estructuras compatibles con biopelículas (Latorre and Muñoz, 2015). Por otro lado, durante la etapa de dispersión, última etapa descrita en la formación de la biopelícula, ocurre el proceso activo de eliminación de microorganismos presentes en la biopelículas al medio. Esta etapa de dispersión puede contribuir con el número total de UFC presentes en la leche de estanque (Latorre *et al.*, 2010). En medicina humana la formación de biopelículas asociadas a *S. aureus* ha sido descrita consistentemente en ambientes hospitalarios, en superficies médicas inertes tales como traquetotubos y prótesis médicas (Crampton *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2002; Singhal *et al.*, 2011), como también heridas crónicas e infecciones persistentes han sido identificada en humanos (Davis *et al.*, 2008; James *et al.*, 2008; Singhal *et al.*, 2011).

#### **Formación de biopelículas por *S. aureus* principales hallazgos.**

En la formación inicial de una biopelícula de *S. aureus*, se ha identificado que el locus *ica* tendría un rol importante al codificar el antígeno capsular/adhesina (PS/A) y la proteína de adhesión intercelular (PIA) (Crampton *et al.*, 1999; Vasudevan *et al.*, 2003). La habilidad de adhesión *in vitro* de cepas de *S. aureus* de origen intra y extramamario ha sido evaluada por Fox *et al.* (2005). En esta investigación se identificó que cepas con alta habilidad de formación de biopelículas correspondía al grupo de cepas aisladas

desde leches provenientes de IMI. De esta forma se sugiere que ésta alta la habilidad formadora de biopelículas potenciaría a éstas cepas su habilidad para causar IMI por sobre las cepas ambientales (Vasudevan *et. al*, 2003).

En la industria alimentaria, la formación de biopelículas en superficies en contacto con los alimentos es una potencial fuente de contaminación con microorganismos que pueden causar problemas en la salud pública. Debido a la unión estrecha de las biopelículas y las superficies de adhesión, se considera que la remoción de estas biopelículas un proceso requiere procedimientos físicos que puede dañar la superficie del equipo (Latorre *et. al*, 2009). Diferentes agentes de limpieza han sido estudiados para la remoción de biopelículas *in vitro* de biopelículas causadas por *S. aureus*. Es más, se describe que la biopelícula formada por *S. aureus* es más gruesa y difícil de remover desde superficies de acero inoxidable al ser comparada con microorganismo tales como *E. coli* (Furukawa *et al.*, 2010).

La presencia de biopelículas en operaciones lecheras, específicamente, en equipos de ordeño, es una posible fuente de microorganismos potencialmente dañinos para la salud de la población como es el caso de *S. aureus*. Por otra parte, se describe que cepas de *S. aureus* presentes en unidades de ordeño pueden no ser capaces de formar biopelículas debido a que son constantemente arrastradas debido a la limpieza del equipo de ordeño (al menos 2 veces por día) (Fox *et al.*, 2005) . En la provincia de Ñuble, fallas en los protocolos de limpieza permiten sugerir que cepas de *S. aureus* podrían formar biopelículas en equipo de ordeño. La presencia de biopelículas constituidas por sólo *S. aureus* o asociadas a otros grupo de microorganismos en superficies en industrias procesadoras de productos lácteos ha sido descrita (Cherif-Antar *et. al*, 2016). Sin embargo, la evaluación de la presencia de cepas de *S. aureus* en estructuras que

toman contacto directo con la leche como el equipo de ordeño con adherencias macroscópicas/biopelículas y leche de estanque a nuestro conocimiento no había sido evaluado. Existen múltiples trabajos que reportan la capacidad formadora de biopelículas de *S. aureus* basándose en su habilidad de adhesión en ensayo de adherencia en microplaca (**MPA**, *microtater plate assay*) (Stepanovic *et. al* 2007, Latorre *et. al* 2009, Lee *et. al*, 2014). Éste es un método de *screening* de habilidad de adherencia ampliamente utilizado para evaluar la potencial habilidad formadora de biopelícula de cepas de microorganismos.

En el capítulo 1 de la presente investigación describimos 8 operaciones lecheras de la provincia de Ñuble se han reportado estructuras de adherencia visibles macroscópicamente de las que se aisló *S. aureus*. Adicionalmente, en éstas adherencias se han podido observar bacterias con características cocoides y aislado pulsotipos de *S. aureus*, tal como se hizo mención en granja incluidas en el análisis de diversidad del capítulo 1. La habilidad de desarrollar biopelículas por cepas de *S. aureus* aisladas de leche de estanque o adherencias a nuestro conocimiento no ha sido evaluada. Por lo anterior, el objetivo del presente capítulo es evaluar la habilidad de adherencia de cepas de *S. aureus* identificados previamente desde adherencias macroscópicas/biopelículas presentes en superficies en contacto con leche y leche de estanque de la región de Ñuble.



Existen diferencias entre la habilidad *in vitro* de adherencia a poliestireno entre cepas de *S. aureus* identificadas desde leche de estanque y, cepas identificadas desde adherencias macroscópicas del equipo de ordeño.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar *in vitro* la habilidad de adhesión de cepas de *S. aureus* obtenidas desde muestras de leche de estanque y superficies en contacto con la leche en operaciones lecheras de la región de Ñuble.

### **Objetivos específicos.**

1. Evaluar la habilidad *in-vitro* de adherencia a poliestireno de cepas de *S. aureus* identificadas en muestras de leche de estanque y superficies de equipo de ordeño utilizando el ensayo de adherencia en microplacas.
2. Comparar la habilidad *in-vitro* de adherencia a poliestireno de cepas de *S. aureus* identificadas desde muestras de leche de estanque y superficies de equipo de ordeño.

## MATERIALES Y MÉTODO

### ***Cepas de S. aureus evaluados por ensayo de adherencias***

Se seleccionaron 19 cepas de *S. aureus* desde 19 lecherías de la región de Ñuble. Estas cepas de *S. aureus* corresponden a la combinación de pulsotipos y perfiles de virulencia más frecuentemente identificados en la región de Ñuble y previamente caracterizados en el capítulo 2 y 3. Las cepas evaluadas son las siguientes: **Distribución BTM-AMES**: cepas presentes en leche de estanque y AMES de una misma lechería (A-PV1, B-PV1, C-PV2, D-PV1, G-PV1, H-PV1, I-PV1, J-PV1, K-PV1, W-PV1) y cepas presentes identificadas sólo desde leche de estanque (B.2-PV1, E-PV1, E.11-PV1, F-PV1, F.1-PV1, F.12-PV2, L-PV1, K-PV3, N-PV1, O-PV4, Q-PV1, R-PV2, T-PV1, U-PV1, W.2-PV1). Adicionalmente los criterios de inclusión de los pulsotipos incluyen: i) **Persistentes en rebaño**: única cepa de *S. aureus* identificada en 3 muestras diferentes de leche de estanque en lechería (B.2-PV1, D-PV1, E.11, G-PV1, Q-PV1, T-PV1, U-PV1); ii) **Esporádico en rebaño**: Cepas de *S. aureus* identificada en 2 de 3 muestras de leche de una lechería (C-PV1, F-PV1, F.1-PV1, L-PV3, R-PV2, W.2-PV2); iv) **Distribuido entre rebaños**: cepas presentes en más de un rebaño (A-PV1, D-PV1, E-PV1, J-PV1, K-PV1, N-PV1, Q-PV1); v) **Infrecuente**: se incluyeron 2 cepas infrecuentes identificada sólo una vez, F.12 (identificada en granja sea<sup>+</sup>); K-PV3 (variante de K con gen sea<sup>+</sup>) y O-PV4 con perfil *icaA*<sup>(-)</sup> e *icaD*<sup>(-)</sup> (**Tabla 4.1**). En la evaluación de adherencia se incluyó el pulsotipo K en 2 perfiles de virulencia, PV1 y PV3, en ambos casos con el gen *icaA* e *icaD* presente, pero el PV3 con la presencia del gen *sea* que codifica la enterotoxina A. Adicionalmente, se incluyeron 3 aislados correspondientes a la cepa G-PV1 para evaluar la consistencia de resultados de adherencia de una cepa un mismo perfil clasificada en capítulos anteriores como clones.

**Tabla 4.1. Cepas de *S. aureus* seleccionados para el ensayo de adherencia en microplacas de poliestireno identificadas desde leche de estanque (BTM) y adherencias macroscópicas en superficie de equipo de ordeño (AMES). Fuente: Elaboración Propia.**

Aislado	Pulsotipo	Lechería	Perfil de Virulencia <sup>1</sup>	BTM	AMES	Criterio
		a				
L1-085	A	1	PV1	1/3	ND	‡, *
		<u>2</u>	<u>PV1</u>	<u>1/3</u>	+	
L1-556	B	<u>16</u>	<u>PV1</u> ; PV2	<u>3/3</u> ; 2/3	+,+	‡
L1-1114	B.2	<u>29</u>	<u>PV1</u>	<u>3/3</u>	ND	●, ◆
L1-009	C	<u>1</u>	<u>PV2</u> ; PV4	<u>2/3</u> ; 0/3	+,-	‡
L1-204	D	1	PV1; PV2	ND	+,-	●, ‡, *
		9	PV1; PV2	3/3; 2/3		
		<u>10</u>	<u>PV1</u> ; PV2	<u>2/3</u> ; 1/3	+,+	
L1-131	E	<u>5</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	ND	*
		6	PV1, PV2	1/3; 1/3	ND	
		12	PV1	ND		
L1-483	E.11	<u>14</u>	<u>PV1</u>	<u>3/3</u>	ND	●
L1-627	F	<u>17</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	ND	◆
L1-630	F.1	<u>17</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	ND	◆
L1-279	F12	<u>11</u>	<u>PV2</u>	<u>1/3</u>	ND	
L1-653;	G*	<u>19</u>	<u>PV1</u>	<u>3/3</u>	+	●, ‡
L1-657						
L1-278	H	<u>12</u>	<u>PV1</u>	<u>1/3</u>	+	‡
L1-461	I	<u>12</u>	<u>PV1</u>	1/3	+	‡
L1-255	J	<u>12</u>	<u>PV1</u> , PV2	<u>1/3</u>	+	‡, *
L1-132	K	<u>5</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	+	*
L1-271		<u>11</u>	<u>PV3</u>	<u>1/3</u>	ND	
		12	PV1	ND	+	
L1-270	L	<u>11</u>	<u>PV3</u>	<u>2/3</u>	ND	◆
L1-644	N	<u>18</u>	<u>PV1</u>	<u>1/3</u>	ND	*
		6	PV1	1/3	ND	
L1-224	O	<u>9</u>	PV2, <u>PV4</u>	1/3, <u>1/3</u>	ND	
L1-642	Q	4	PV1	2/3	ND	●, *
		<u>18</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	ND	
L1-661	R	<u>20</u>	<u>PV2</u>	<u>2/3</u>	ND	◆
L1-747	T	<u>21</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	ND	●
L1-888	U	<u>23</u>	<u>PV1</u>	<u>3/3</u>	ND	●
L1-1149	W	<u>30</u>	<u>PV1</u>	<u>3/3</u>	+	‡
L1-1152	W.2	<u>30</u>	<u>PV1</u>	<u>2/3</u>	ND	◆

PV: Perfil de Virulencia, <sup>1</sup>Todos las cepas son *coa*(+) *nuc*(+) *fnbA*(+) *seb*(-) *mecA*(-) y *mecC*(-); PV1: *icaA*(+) *icaD*(+) *sea*(-); PV2: *icaA*(-) *icaD*(+) *sea*(-); PV3: *icaA*(+) *icaD*(+) *sea*(+); PV4: *icaA*(-) *icaD*(-) *sea*(-); “\_”: subrayado indica ‡: Distribución BTM-AMES, cepas presentes en leche de estanque y AMES de una misma lechería; perfil evaluado en ensayo; ●: Persistentes en rebaño, cepas de *S. aureus* identificado en las 3 muestras de leche de estanque en lecherías con sólo un clon de *S. aureus* identificado; ◆: Esporádico en rebaño: Cepas de *S. aureus* identificado en 2 de 3 muestras de leche de una lechería; ‡: Distribuido entre rebaños: cepas presentes en más de un rebaño; ⚡: Infrecuente: se incluyeron 2 cepas infrecuentes identificada sólo una vez, F.12 (identificada en granja *sea*\*); y O-PV4 con perfil *icaA*(-) e *icaD*(-). G\*: Pulsotipo procesado en MPA con 2 aislados diferentes para así evaluar consistencia de resultados entre pulsotipos.

**Ensayo de adherencia en microplacas (MPA).** Para realizar la categorización de las cepas de *S. aureus* acorde a su habilidad de adherencia en poliestireno, se utilizó el protocolo de ensayo de adherencia en microplaca o MPA (*microtiter plate assay*) descrito en Latorre *et al.* (2011) con modificaciones menores. Cada ensayo se repitió 3 veces. Brevemente, una colonia por cada cepa de *S. aureus* (Tabla 4.1) fue cultivada en agar BHI e incubada a 37°C por 24 h. Posteriormente, de cada cultivo con un asa estéril de 1µl una colonia fue inoculada en 10 mL de caldo de tripticasa de soya (*Trypticase soy broth*, TSB, BD, Sparks, MD) e incubado a 37°C por 18 h. Finalizado el periodo de incubación, 100 µL de la suspensión bacteriana fueron agregadas a 10 mL de TSB, se homogenizaron con vortex y se ajustó a una turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Posteriormente, por cada cepa, 100µL de cada cultivo fueron distribuido en 8 pocillos de una placa estéril de fondo plano de 96 pocillos (Placa 96 Pocillos Elisa F/Plano N/ BD, Falcon). Las placas fueron cubiertas con la tapa de PVC proporcionadas por el fabricante e incubadas a 37°C por 48h. Finalizado el período de incubación, los pocillos fueron lavados tres veces con 150 µL de agua destilada estéril y secados a temperatura ambiente por 45 min. Posteriormente, los pocillos fueron teñidos con 150 µl de cristal violeta (1%) durante 45 min. Los pocillos fueron invertidos para eliminar el exceso de líquido y permitir su secado y posterior almacenamiento a temperatura ambiente hasta el ensayo de medición cuantitativa. En cada lote de ensayo fueron incluidos como controles: cepa *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442 altamente formadora de biopelículas (control positivo, Latorre *et. al.*, 2011); una cepa descrita como con baja habilidad formadora de biopelículas (control negativo, *S. epidermidis* ATCC 12228; da Souza da Cunha, 2014) y TSB (control negativo de medio o blanco).

**Habilidad de adherencia de cepas de *S. aureus*.** La adherencia de los aislados fue cuantificada, utilizando como indicador, la medición de cristal violeta de acuerdo a lo descrito en Latorre *et. al.* (2011). Para esto, 150µL de etanol fueron adicionados en cada pocillo para solubilizar las bacterias teñidas adheridas en el pocillo de poliestireno. Las placas fueron cubiertas con la tapa de PVC e incubadas a temperatura ambiente durante 1 h. Posterior a la incubación, la solución de cristal violeta fue mezclada aproximadamente 10 veces por pocillo y medida su densidad óptica directamente desde el fondo de las placas de PVC a 590 nm (OD<sub>590</sub>) en equipo Epoch™ de BioTek. La lectura de medición de 590 nm fue seleccionada posterior a la lectura de la placa en espectro de 400 nm a 700 nm; identificando los 590 nm como la densidad de mayor eficiencia de lectura. El promedio de OD<sub>590</sub> del extracto de etanol fue calculado para cada cepa de *S. aureus* y controles. Para cada cepa, el promedio del control blanco fue restado al promedio de cada cepa de *S. aureus*. Las cepas de *S. aureus* fueron clasificadas de acuerdo a su capacidad de adherencia en 3 categorías (alta, media y baja) de acuerdo a los parámetros descritos por Stevanovic *et. al.* (2000) (Lee *et. al.*, 2014). Para determinar la capacidad de los pulsotipos de *S. aureus* para adherirse a poliestireno, se usaron como referencia el valor medio de OD de los controles negativos (ODNC) de 0.081±0.012. Los pulsotipos se consideraron productores de biopelículas cuando sus valores de OD fueron 3 veces mayores que la desviación estándar de la ODNC media. Además, la capacidad de adhesión de los pulsotipos se clasificaron como adherentes débiles (ODNC <OD ≤2 × ODNC), moderados (2 × ODNC <OD ≤4 × ODNC) o fuertes (OD > 4 × ODNC) (Stevanovic *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2014).

**Análisis de datos.** Los resultados de adherencia a poliestireno de los pulsotipos de *S. aureus* fueron analizados utilizando estadística descriptiva y tablas de frecuencia.

Adicionalmente, la habilidad de adherencia al poliestireno entre de cepas identificadas a partir de adherencia y leche de estanque, y cepas solo desde leche fue evaluada utilizando la prueba de Fisher-Exact con un intervalo de confianza de un 95%.



## RESULTADOS

### ***Habilidad de adherencia de cepas de S. aureus***

Los resultados de evaluación de adherencias identificaron 6(25%), 14(58.3%), y 4(16.6%) pulsotipos con alta, mediana y baja habilidad de adherencia a poliestireno, respectivamente (**Tabla 4.2**). Los 10 pulsotipos identificados desde AMES fueron clasificados con habilidad de adherencia media o alta. No se encontraron diferencias significativas entre la habilidad de adherencia de los pulsotipos distribuidos en BTM-AMES(+) y sólo BTM ( $P=0,31$ ).

***Pulsotipos altamente adherentes.*** De las 6 cepas clasificados como altamente adherentes en poliestireno, 5 de ellas (U, F.12, Q, W y W.1) poseen el perfil de virulencia 1 que posee simultáneamente los genes de *icaA* e *icaD*; y uno de ellas (F.12) posee sólo el gen *icaD* (**Tabla 4.3**). De estos 6 pulsotipos, 2 de ellos (ambos con PV1) fueron identificados desde AMES (**Tabla 4.3**). Cabe destacar que la cepa F.12 fue identificada desde la lechería 11 clasificada como enterotoxina A positiva (capítulo 3).

Particularmente el pulsotipo U-PV1, que presentó la mayor habilidad de adherencia entre los pulsotipos evaluados, fue identificado únicamente en la lechería 23 como cepa persistente; sin embargo, sólo se identificó en BTM, y no AMES. Esta lechería en particular, corresponde a la lechería con el rebaño más grande (1020 vacas) y que en su inspección de AMES no presentaba adherencias macroscópicas en ninguna de las superficies evaluadas. Cabe destacar que esta cepa en particular y todos sus aislados (887, 888, 889 y 894) formaron colonias mucosas en el cultivo bacteriológico.

**Tabla 4.2. Habilidad de adherencia de cepas de *Staphylococcus aureus* presentes en leche de estanque (BTM) y adherencias macroscópicas de superficies en contacto con leche (AMES). Fuente: Elaboración Propia.**

Clasificación <sup>1</sup>	Cepas <sup>2</sup>	Densidad Optica
<b>No adherente</b>	<b>0</b>	- -
<b>Alta (Total)</b>	<b>6</b>	<b>0.375 ± 0.071</b>
	BTM-AMES	2 0.366 ±0.021
	BTM	4 0.380 ±0.090
<b>Mediana (Total)</b>	<b>14</b>	<b>0.229 ± 0.043</b>
	BTM-AMES	7 0.190 ± 0.050
	BTM	7 0.201 ±0.058
<b>Baja (Total)</b>	<b>4</b>	<b>0.155 ± 0.006</b>
	BTM-AMES	0 - -
	BTM	4 0.155 ± 0.006



<sup>1</sup>: Clasificación realizada por la densidad óptica (DO) de cada cepa con el promedio de DO de valor negativo (ODNC = 0.081±0.012), de acuerdo a lo descrito por Stepanovic *et al.*, (2000), de la siguiente manera: no productores (OD ≤ ODNC), débil (ODNC < OD ≤ 2×ODNC), moderado (2×ODNC < OD ≤ 4×ODNC), o fuerte (OD > 4×ODNC) adherencia;

<sup>2</sup> : 24 pulsotipos identificados por electroforesis en gel de campo pulsado y perfil de virulencia; valores expresados en media DE de 3 réplicas para cada pulsotipo; BTM-AMES y BTM: Pulsotipos de *S. aureus* identificados en superficies con adherencias macroscópicas y leche de estanque, y leche de estanque, respectivamente.

**Tabla 4.3. Habilidad de adherencia de cepas de *S. aureus* de leche de estanque (BTM) y adherencias macroscópicas en superficie de equipo de ordeño (AMES) identificados en lecherías de la Región de Ñuble. Fuente: Elaboración Propia.**

Adherencia	Pulsotipo	Lechería	Perfil de Virulencia <sup>1</sup>	Superficie en la que la cepa ha sido identificado <sup>1</sup>
Alta	U	23	PV1	ND
	W	30	PV1	Colector
	H	12	PV1	Pezonera, tarro de leche
	F12	11	PV2	ND
	Q	4	PV1	ND
	W.2	30	PV1	ND
Mediana	B	16	PV1	Línea de leche
	L	11	PV3	ND
	K	5	PV1	Válvula del colector
	R	20	PV2	ND
	A	1	PV1	Manguera de leche mastítica
	E.11	14	PV1	ND
	N	18	PV1	ND
	I	12	PV1	Pezonera, Tarro de leche, Manguera larga de leche.
	C	1	PV2	Jarra de leche
	D	10	PV1	Colector, entrada tarro, Manguera de leche.
	B.2	29	PV1	ND
	G*	19	PV1	Tarro de leche
	J	12	PV1	Tarro de leche, salida externa, interna y aspa de estanque; pezonera, tubo corto de leche); Tubo largo de leche.
	O	9	PV4	ND
Baja	K	11	PV3	ND
	F.1	17	PV1	ND
	T	21	PV1	ND
	F	17	PV1	ND
	E	5	PV1	ND

PV: Perfil de Virulencia, <sup>1</sup>Todos los aislados son *coa*(+) *nuc*(+) *fnbA*(+) *seb*(-) *mecA*(-) y *mecC*(-); PV1: *icaA*(+) *icaD*(+) *sea*(-); PV2: *icaA*(-) *icaD*(+) *sea*(-); PV3: *icaA*(+) *icaD*(+) *sea*(-); PV4: *icaA*(-) *icaD*(-) *sea*(-); ND: No detectado.

**Pulsotipos con adherencia media.** Dentro de los pulsotipos clasificados como medianamente adherentes, se identificaron todos los grupos de perfiles de virulencia evaluados: PV1, PV2, PV3, PV4. Destacando que, entre estas cepas, la cepa C-PV2 (*icaD*<sup>+</sup>; *icaA*<sup>-</sup>) aislada en la granja 1 desde AMES de una muestra de jarra de leche con características de poliestireno. Por otro lado, la cepa O-PV4, *icaA*<sup>-</sup> e *icaD*<sup>-</sup>, fue clasificada con habilidad media de adherencia, pese a que no fue identificada en AMES y sólo aisló de una muestra positiva de BTM de una lechería (pulsotipo infrecuente).

El pulsotipo G con el PV1 evaluado en el capítulo 2 aislados de muestra de leche 1 (L1-653) y 3 (L1-657); expresó habilidad media de adhesión en todos los experimentos, sin diferencias entre aislados. Este pulsotipo de baja adherencia, fue aislado de muestras de AMES de tarros de leche. El pulsotipo K, clasificado como de habilidad de adherencia media para ambos perfiles con PV3; *icaA*, *icaD* y gen de enterotoxina estafilocócica A positivo, y el pulsotipo K con PV1 identificado en las lecherías 5 y 12 desde superficies de válvula del colector con características de superficies de poliestireno. El pulsotipo D con PV1, clasificado con adherencia media, fue uno de los pulsotipos mayormente identificado de las muestras de AMES-*S. aureus*<sup>(+)</sup> evaluadas; particularmente desde las lecherías 1 y 10 en manguera de leche mastítica, manguera de leche, colectores y tarro de leche.

**Pulsotipos con baja adherencia.** Los pulsotipos con baja adherencia fueron los pulsotipos infrecuentes (F.1-PV1, F-PV1), distribuidos entre lecherías (E-PV1), y esporádico en leche de estanque (T-PV1).

## DISCUSIÓN

La adhesión es una etapa crítica durante la colonización y la formación de biopelículas del *S. aureus*, tanto en superficies bióticas como abióticas (Sutra and Poultrrel, 1999; Dego *et al.*, 2002; Moormeier and Bayles, 2017). La capacidad de adherencia de una bacteria a una superficie se relaciona tanto, con las propiedades fisicoquímicas de la superficie, como así también con las habilidades del microorganismo de adhesión a la superficie (Bernardes *et al.*, 2012; Di Ciccio *et. al.*, 2015). Nuestros resultados indican que existen cepas de *S. aureus* presentes en leche de estanque con alta capacidad de adhesión a superficies de poliestireno, y con potencial formación de biopelículas, más aún cuando el origen de los pulsotipos corresponde a adherencias *in vivo* con características de biopelículas. La habilidad de adhesión y formación de biopelículas de *S. aureus* en diferentes superficies presentes en el equipo de ordeño, tales como poliestireno, acero inoxidable, silicona ya ha sido descrita (Lee *et al.*, 2014; Latorre and Munoz, 2015; Latorre *et al.*, 2020). Lo anterior, resalta la importancia del control de calidad e higiene durante todo el proceso de elaboración de los productos lácteos involucrando los diferentes eslabones productivos, productores e industria. En Chile, y particularmente en la Región de Ñuble, la cadena de producción de leche se encuentra fragmentada en una interacción de compra-venta entre productores de leche e industria lechera. La calidad inicial de la leche producida y destinado para la industria o elaboración de subproductos tiene un efecto importante en la calidad del producto final (Barbano *et. al*, 2006); lo que resalta la importancia en la higiene de las superficies en contacto con la leche, tanto en las lecherías como en la industria lechera.

Dentro de las metodologías utilizadas para evaluar la capacidad de formación de biopelículas en *S. aureus*, se incluyen el cultivo en Agar Congo-rojo, evaluación de

adherencia en tubo de borosilicato, presencia de genes *icaA* e *icaD* y ensayo de adherencia en placa, siendo estos 2 últimos ampliamente utilizados (Knobloch *et al.*, 2002; de Souza, 2014; Cruzado-Bravo *et al.*, 2019). El operón *ica* permite la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) que se ha asociado con la capacidad patogénica de *S. aureus* y de amplia frecuencia entre aislados de *S. aureus* a partir de IMI (Melchor *et al.*, 2011). Pese a lo anterior, en nuestro estudio, describimos la presencia de cepas con negativas para el gen *icaA* (PV2); o *icaA* e *icaD* (PV4) con alta o mediana habilidad para adherirse a superficies de poliestireno *in-vitro*. Adicionalmente, en el caso particular de la cepa C ha sido aislada desde superficies asociadas a adherencias macroscópicas. Lo anterior puede atribuirse a que existan otros mecanismos, descritos en *S. aureus* capaces de compensar la ausencia del operón *ica*, tal como la proteína de adhesión a biopelícula (BAP), no evaluada para nuestros pulsotipos (da Souza da Cunha, 2014). En Chile, aislados de *S. aureus* aislados de muestra de leche de animales con IMI clínicas y subclínicas, poseen 37 % (n=46) de adherencia débil, 48% (n=59) moderada y 15 % (n=19) alta (Mella *et al.*, 2016). Estos resultados, coinciden con la mayor proporción de *S. aureus* medianamente adherentes (60%), identificados en nuestro estudio. Más aún, la proteína BAP ha sido previamente descrita como de importancia entre cepas de *S. aureus* aisladas de IMI (Cucarella *et al.*, 2004). Aunque *S. aureus* presenta múltiples proteínas que le permiten unirse a la matriz del huésped, como por ejemplo *fnbA* (capítulo 3). En ausencia de moléculas de la matriz extracelular, *S. aureus* puede unirse a superficies abióticas a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas tal como se demostró en ensayos de biopelículas estáticas donde las superficies de poliestireno con carga diferente producen la unión y el desarrollo general de la biopelícula (Kennedy and O'Gara, 2004). Además, los ácidos teicoicos que tienen

cargas negativas, han sido implicado en la unión a poliestireno y superficies de vidrio (Gross *et. al.*, 2001). Desde la perspectiva de habilidad de adherencia por MPA de *S. aureus* aislados de superficies presentes en el equipo de ordeña, Lee *et. al.*, (2014), analizó la habilidad de adherencia de cepas aisladas desde equipo de ordeño y en leche de estanque, identificando 54.8% como no adherente (n=17), 29% con adherencia débil (n=9), 6.5% moderados (n=2), y 9.7% altamente adherentes. Diferencias en las frecuencias de habilidad de adherencia por MPA pueden atribuirse a que Lee *et. al.*, (2014) incluyeron en su estudio cepas aisladas de superficies no asociadas a adherencias o biopelículas, como los incluidos en nuestro estudio. Esta diferencia podría justificar la alta proporción de cepas no adherentes en poliestireno. No obstante, en la investigación de Lee *et al.*, (2014), se presentan pulsotipos clasificados con baja adherencia y capaces de formar biopelículas en superficies de goma y acero inoxidable. Por lo anterior, el evaluar la habilidad de adherencia y formación de diferentes superficies presentes en el equipo de ordeña como vidrio, goma y silicona es importante en la evaluación de habilidad de formación de biopelículas, considerando que la habilidad de las adherencia de las cepas podría haber variado dependiendo del material utilizado como superficie de contacto.

En Chile, el reglamento sanitario de los Alimentos en su Párrafo IV Del proyecto y construcción de los establecimientos de los alimentos en su artículo 25, inciso J, indica que “Los materiales de revestimiento aplicados a las superficies de trabajo y a los equipos que puedan entrar en contacto directo con los alimentos, no deberán ceder sustancias tóxicas o contaminantes a los alimentos, modificando los caracteres organolépticos y de inocuidad” (RSA, 2016; <https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=71271>). El acero inoxidable, ha sido

considerado como una de las superficies óptimas para las superficies en contacto con alimentos por su baja afinidad para adherencia de microorganismos dada por las características de su superficie. No obstante, se ha demostrado que la presencia de leche en superficies de acero inoxidable modifica su carga y afinidad por microorganismos bacterianos, permitiendo su adhesión (Bernardes *et. al.*, 2012). El estanque de leche y sus partes son de acero inoxidable que se mantienen a 4°C cuando están con leche. La temperatura de refrigeración es esencial para evitar crecimiento bacteriano en la leche almacenada en el estanque. Sin embargo, se ha reportados que dicha temperatura disminuye la habilidad de cepas de *S. aureus* de adherirse a acero inoxidable (Cruzado-Bravo *et al.*, 2019). De tal forma, un aspecto clave es el considerar la importancia de lavado del estanque posterior al retiro de leche dado que durante este periodo de lavado, las superficies con remanentes de leche y bacterias, se encuentran a temperatura ambiente. En nuestro estudio, el pulsotipo J fue clasificado con habilidad de adherencia media y fue identificado en partes del aspa, salida interna o externa de estanque, como así también en muestras de leche de estanque, tarros de leche, pezonera y muestras de leche individual de animales de la misma lechería (Latorre *et. al.*, 2020).

En el medio ambiente, las biopelículas pueden estar compuestas por diversas, especies o cepas de bacterias. El pulsotipo F12-PV2 identificado con de alta habilidad para adherirse a poliestireno y tiene origen en la lechería 11, descrita en el capítulo 2 y 3, donde se identificaron pulsotipos que poseen el gen *sea*, codificador de la enterotoxina A (PV3). En este sentido, una cepa con alta capacidad de adherencia, podría iniciar la formación de una biopelícula que permita que cepas no necesariamente adherentes se

asocien posteriormente; como es el caso de los pulsotipos K-PV3 y L-PV3, ambos sea positivos representando un potencial riesgo para la salud pública.

Considerando los antecedentes presentados en este capítulo, la presencia de cepas en biopelículas como en leche de estanque potencialmente podrían adherirse a superficies que está en contacto con leche y que posteriormente será destinada para el consumo humano, representa un potencial riesgo y de importancia en salud pública.



## **CONCLUSION**

No existe diferencia en la habilidad de adherencia a poliestireno *in vitro* de cepas de *S. aureus* identificadas en muestras de leche de estanque y cepas de *S. aureus* con distribución clonal en adherencias macroscópicas y leche de estanque.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, B., Amorena, B., & Iturralde, M. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Veterinary microbiology* 78(2):183-191.
- Barbano, D.M., Y. Ma, and M. V. Santos. 2006. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *J. Dairy Sci.* Vol. 89 (E. Suppl.): 15–19.
- Bauer, T. T., Torres, A., Ferrer, R., Heyer, C. M., Schultze-Werninghaus, C., & Rasche, K. 2002. Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens. *Monaldi archives for chest disease*, 57(1), 84-87.
- Bernardes, P. C., Araújo, E. A., Pires, A. C. D. S., Júnior, F., Queiroz, J. F., Lelis, C. A., & Andrade, N. J. D. (2012). Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1261-1268.
- Cherif-Antar, A., B. Moussa–Boudjemâa, N. Didouh, K. Medjahdi, B. Mayo, and A.B. Flórez. 2016. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science & Technology* 96:27–38. doi:10.1007/s13594-015-0235-4.
- Cramton, S.E., C. Gerke, N.F. Schnell, W.W. Nichols, and F. Götz. 1999. The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infection and Immunity* 67:5427–5433.
- Cruzado-Bravo, M.L.M., N.C.C. Silva, M.X. Rodrigues, G.O.E. Silva, E. Porto, and G.L. Sturion. 2019. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp.

isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. *Food Research International* 122:450–460. doi:10.1016/j.foodres.2019.04.017.

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.

Davis, S. C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W. H., & Mertz, P. M. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *wound repair and regeneration*, 16(1), 23-29.

DeGo, O.K., J.E. van Dijk, and H. Nederbragt. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary Quarterly* 24:181–198. doi:10.1080/01652176.2002.9695135.

de Souza da Cunha, M. L. R. 2014. *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative Staphylococci: Virulence, Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Biosciences Institute, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A. R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50, 930-936.

- Fox, L. K., Zadoks, R. N., and Gaskins, C. T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary microbiology*, 107(3), 295-299.
- Furukawa, S., Akiyoshi, Y., Komoriya, M., Ogihara, H., & Morinaga, Y. 2010. Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. *Food Control*, 21(5), 669-672.
- Gross, M., S.E. Cramton, F. Götz, and A. Peschel. 2001. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infection and Immunity* 69:3423–3426. doi:10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001.
- Harvey, J., K. P. Keenan and A. Gilmour. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* 24: 380-392.
- 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.
- James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., & Stewart, P. S. 2008. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), 37-44.
- Kennedy, C.A., and J.P. O’Gara. 2004. Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53:1171–1173. doi:10.1099/jmm.0.45764-0.

Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A., Rohde, H., & Mack, D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Medical microbiology and immunology, 191(2), 101-106. [http://doi. 10.1007/s00430-002-0124-3](http://doi.10.1007/s00430-002-0124-3)

Latorre, A. A., Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Zadoks, R. N., Boor K. and Y. Schukken. 2009. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. Applied and environmental microbiology 75(5): 1315-1323.

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. A., J. A. S. Van Kessel, J. S. Karns, M. J. Zurakowski, , A. K. Pradhan, K. J. Boor, E. Adolph, S. Sukhnanand and Y. H. Schukken. 2011. Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. Applied and environmental microbiology 77(11): 3676-3684.

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.

Latorre, A.A., P.A. Pachá, G. González-Rocha, I. San Martín, M. Quezada-Aguiluz, A. Aguayo-Reyes, H. Bello-Toledo, R. Oliva, A. Estay, J. Pugin, and M.A. Muñoz. 2012. On-Farm Surfaces in Contact with Milk: The Role of *Staphylococcus aureus*-Containing Biofilms for Udder Health and Milk Quality. *Foodborne Pathogens and Disease*.

Lee SH, Mangolin BL, Gonçalves JL, Neeff DV, Silva MP, Cruz AG, Oliveira CA. 2014. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *J Dairy Sci* 2014;97:1812–1816.

Mella A., C. Contreras, F. Ulloa y J. Kruze. 2016. Genes de virulencia y capacidad de adherencia en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en rebaños lecheros del sur de Chile. Red Latinoamericana de Investigación en mastitis (RELIM), Puerto Varas, Chile.

Melchior, M.B., M.H.J. van Osch, T.J.G.M. Lam, J.C.M. Vernooij, W. Gaastra, and J. Fink-Gremmels. 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *Journal of Dairy Science* 94:5926–5937. doi:10.3168/jds.2011-4243.

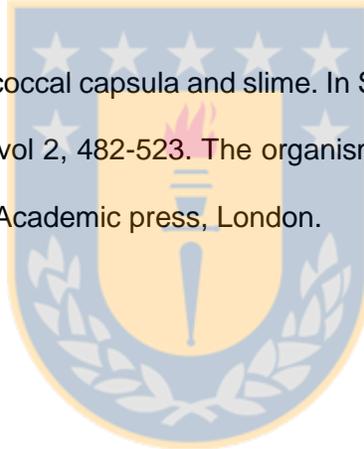
Moormeier, D.E., and K.W. Bayles. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology* 104:365–376. doi:10.1111/mmi.13634.

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5): 664-698.
- Singhal, D., Foreman, A., Bardy, J. J., & Wormald, P. J. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms. *The Laryngoscope*, 121(7), 1578-1583.
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
- Stepanović, S., D. Vuković, I. Dakić, B. Savić, and M. Švabić-Vlahović. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40:175–179. doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., BONAVENTURA, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
- 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.
- Vancraeynest, D., Hermans, K., & Haesebrouck, F. 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.

Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 92(1), 179-185.

Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., & Montel, M. C. 2012. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and environmental microbiology*, 78(2): 326-333.

Wilkinson B.J., Staphylococcal capsula and slime. In *Staphylococci and Staphylococcal infections*. 1983: vol 2, 482-523. The organism in vivo e in vitro. C.S.F. Easmon and Adlam (Ed). Academic press, London.



## CAPITULO 5

### DISCUSIÓN GENERAL

La diversidad genética, dinámica y virulencia en cepas de *S. aureus* de origen intramamario, como extramamarios que potencialmente puedan causar IMI, han sido documentadas ampliamente en operaciones lecheras (Larsen *et al.*, 2000; Zadoks *et al.*, 2002; Ruegg, 2017; Rowe *et al.*, 2019). No obstante, considerando que la leche producida es principalmente destinada para consumo humano, poco se ha investigado respecto a las características de virulencia de cepas de *S. aureus* presentes en muestras de leche de estanque, y su potencial relación con las cepas presentes en adherencias/biopelículas en el equipo de ordeño (Boos *et al.*, 2015). De ésta forma, el principal objetivo de la presente investigación fue evaluar la diversidad genética, virulencia y habilidad de adherencia de cepas *S. aureus* aisladas desde muestras de leche de estanque y adherencias macroscópicas en superficies en contacto con la leche. Con la intención final de contribuir al conocimiento de la epidemiología de éste patógeno intramamario y potencial patógeno humano, en operaciones lecheras. A este respecto, en el presente capítulo se destacan y discuten los principales hallazgos identificados en los diferentes capítulos anteriormente desarrollados.

#### **Contribuciones del presente estudio al conocimiento de *S. aureus* en lecherías de Ñuble**

La presente investigación confirma una amplia diversidad genética de cepas de *S. aureus* entre muestras de leche y superficies en lecherías de en la región de Ñuble (SID=0.99), consistente con resultados previamente descritos en la región (Pacha, 2015). No obstante, pese a la diversidad genética de estos aislados, el perfil de virulencia

*coa*<sup>(+)</sup> *nuc*<sup>(+)</sup> *fnbA*<sup>(+)</sup> *icaA*<sup>(+)</sup>*icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup> *seb*<sup>(-)</sup> *mecC*<sup>(-)</sup>*mecA*<sup>(-)</sup> estaba ampliamente distribuidos entre todas las lecherías evaluadas. Más aún, la proteína de adhesión a fibronectina y descrita como importante en la infección intramamaria (Jett and Gilmore, 2002; Pereyra *et. al.*, 2016), es altamente conservada tanto en aislados de leche de estanque y de adherencias/biopelículas de la región de Ñuble. Por otro lado, entre las lecherías la presencia y diversidad de cepas varió de heterogénea a clonal. Diversas pueden ser las causas que pueden modificar la presencia de patógenos intramamarios presentes en leche de estanque, particularmente de *S. aureus*. La principal fuente de este microorganismo en leche corresponde a infecciones intramamarias que elimina el microorganismo de manera intermitente y permitiendo infecciones cruzadas entre vacas y cuartos mamarios (Zadoks *et al.*, 2011; Rowe *et al.*, 2019). Las características individuales de cada lechería basada por ejemplo en el número de animales, medidas de manejo de animales, rutina de ordeño, e higiene del equipo de ordeño, puede explicar que la dinámica de *S. aureus* varíe entre lecherías. A este respecto, el papel que juegan las cepas de *S. aureus* extramamarias como potenciales agentes causales de IMI es controversial. Algunos autores vinculan una relación genética entre ellos (Haveri *et al.*, 2008); mientras otros lo descartan (Zadoks *et. al.*, 2002). Complementarios a estos antecedentes, la presente investigación resalta el potencial rol de las adherencia en el equipo de ordeño como causal de contaminación de la leche de estanque.

### ***Rol de adherencias/biopelículas en leche de estanque de S. aureus***

La presente investigación permite, en conjunto con lo reportado por Latorre *et al.*, (2020), reportar cepas con el mismo pulstipo (clones) presentes en animales, en adherencias/biopelículas y muestras de leche de estanque de una misma lechería. Respecto a la dinámica de *S. aureus* en las lecherías, se ha aceptado ampliamente el

concepto de que una cepa o un limitado número de cepas de *S. aureus* son las responsables de la gran mayoría de IMI, y que su transmisión se realiza durante el ordeño principalmente a través de toallas de secado (no individuales), manos del ordeñador, y unidades de ordeño (Zadoks *et al.*, 2011; Rowe *et al.*, 2019). *Staphylococcus aureus* se comporta como un microorganismo predominantemente contagioso, no siendo la glándula mamaria el único reservorio de este microorganismos en el rebaño. Por lo anterior, pese a que múltiples esfuerzos realizados en la rutina de ordeño para evitar la transmisión de *S. aureus* durante el ordeño, estos podrían verse opacado por una deficiente higienización y limpieza del equipo de ordeño en superficies en contacto con el pezón tal como pezoneras (Lee *et al.*, 2014). En el caso particular de la granja 12, se identificó que los pulsotipos H, I y J, presentes en las pezoneras, son genéticamente indistinguibles de los pulsotipos causantes de IMI del rebaño y de los presentes en leche de estanque (Latorre *et al.*, 2020). La dinámica de los microorganismos puede cambiar entre lecherías, por lo anterior la potencial dinámica animales-biopelículas-leche de estanque descrita para la granja 12 se sugiere evaluar en futuras investigaciones en otras lecherías. Los pulsotipos de las cepas ambientales podría aumentar la diversidad de estos en leche de estanque y no sólo atribuirse la presencia de *S. aureus* en leche de tanque como de origen único a partir de leche de vacas con IMI. La clonalidad de pulsotipos entre AMES y BTM observada en 7 lecherías de la región de Ñuble destaca el potencial rol de adherencias en el equipo de ordeño en la contaminación de BTM.

#### ***Dinámica de cepas entre muestras de leche de estanque.***

Usualmente, la interpretación de *S. aureus* aislados de muestras de BTM, no contempla el análisis molecular de subtipificación y usualmente se identifican y clasifican basados

en características morfológicas y bioquímicas. En los pulsotipos evaluados, el gen de la coagulasa y nucleasa es altamente conservado, por lo que estas pruebas no permitirían discriminar entre cepas diferentes. La variabilidad de patrones de pulsotipos de *S. aureus* entre muestras de leche de estanque, permite remarcar la potencial variabilidad de cepas identificables dentro y entre muestras de leche de estanque de una lechería. *Staphylococcus aureus* es un patógeno intramamario y también potencial patógeno humano ampliamente aislado desde muestras de leche de estanque en lecherías en diferentes regiones del mundo incluidos Asia (Bi *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2017); África (Said *et al.*, 2016), Oceanía (Macmillan *et al.*, 2019), Europa (Boos *et al.*, 2015; Parisi *et al.*, 2016), America del Norte (Jayarao *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2018) y America del Sur (Pacha *et al.*, 2015). En Chile, *S. aureus* ha sido identificado como uno de los principales agentes causantes de IMI (San Martín *et al.*, 2001; Mella *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2018); sin embargo la frecuencia de identificación de éste microorganismo en BTM no ha sido ampliamente reportada. En lecherías de las ex provincias del Biobío y Ñuble se reporta un 58% de frecuencia entre 65 lecherías evaluadas (Pacha, 2015). Considerando únicamente las 19 lecherías evaluadas en la investigación del 2015 que forman parte actual de la región de Ñuble e involucran el territorio evaluado en nuestra actual investigación, un 100% de ellas fue positivas a *S. aureus* (comunicación personal). Éstos resultados al contrastarlos con los resultados de frecuencia de las lecherías positivas en nuestra presente investigación (76%) indican una alta frecuencia de identificación de éste microorganismo en lecherías de la región de Ñuble. El análisis de la leche de estanque es una herramienta útil y tradicionalmente utilizada para determinar la calidad de la leche del rebaño, como así también para monitorear la presencia de infecciones intramamarias dentro del rebaño (NMC, 1999; Jayarao *et al.*, 2004). Dentro de los

programas de salud mamaria, se considera la identificación bacteriológica de microorganismos contagiosos y recuento celular somático para evaluar la salud mamaria del rebaño (Jayarao *et. al.*, 2004). Nuestro estudio evalúa la abundancia de pulsotipos de *S. aureus* leche de estanque, En este sentido, datos aportados por nuestro estudio permiten describir la diversidad de cepas de *S. aureus* presentes en BTM, como así también, el patrón y dinámica de eliminación de estas cepas en muestras seriadas de leche de estanque. Estos resultados toman importancia al considerar que durante la vigilancia de patógenos intramamarios, el cultivo bacteriológico en leche de estanque es realizado sin subtipificación. En este sentido, para lecherías con más de una cepa de *S. aureus* entre o dentro de muestras de leche de estanque, como lo observado en las lecherías 1, 2, 6, 9, 11, 20, 12, 17, 18, 28 y 30, si el diagnóstico de *S. aureus* se realiza utilizando la metodología estándar de diagnóstico, la abundancia de cepas estaría subdiagnosticada.

### ***Relación de tipos principales y subtipos de S. aureus***

Desde 1940, *S. aureus* ha sido descrito como un microorganismo con capacidad de adaptación a presión selectiva de agentes antimicrobianos tales como lo son los  $\beta$ -lactámicos Penicilina y Meticilina. Asimismo, este microorganismo se adapta a diversas condiciones de laboratorio, sobreviviendo y multiplicándose en un amplio rango de temperaturas, pH, concentraciones de oxígeno, y concentraciones de sal, entre otras. Estas características, reflejan los mecanismos de adaptación adquiridos por este patógeno. Se ha demostrado que las bacterias evolucionan y se transmiten rápidamente con clones emergentes, como respuesta de adaptación y propagación global durante años o décadas (Bentley and Parkhill, 2015). De esta forma, se podría considerar que presencia de pulsotipos estrechamente relacionados, como por ejemplo lo observado

en las lecherías 2 (A, A.2), 16 (B, B.1), 27(V, V.1) y 30 (W, W.2) podría deberse a cepas que han ido adaptándose al ambiente en cada lechería. Más aún, considerando que se describen variaciones entre virulencias de un mismo pulsotipo (Tabla 3.6). La modificación genética bacteriana se da principalmente por mutaciones específicas, re-arreglos genéticos y transferencia horizontal de genes. En este último grupo destacando los mecanismos de conjugación, transducción y transformación de genes fundamentales para la transmisión de factores de virulencia (Alibayov *et al.*, 2014; de Souza da Cunha, 2014; Zeaki *et al.*, 2015). La transferencia horizontal del gen de la enterotoxina A mediada por fagos, ha sido previamente descrita y podría explicar en parte, porque cepas genéticamente no relacionadas presentes en leche de estanque de la granja 11, presentan la misma secuencia de un gen no conservado para esta especie.

*Staphylococcus aureus* ha sido descrito como un patógeno extraordinariamente versátil, responsable de intoxicaciones alimentarias, infecciones hospitalarias y comunitarias, tal como el síndrome de shock tóxico (Argudin *et al.*, 2010). Es más, se ha descrito que el metagenoma de *S. aureus* contiene hasta 10 genes que codifican enterotoxinas estafilocócicas, que son responsables de los síntomas clínicos asociados con la intoxicación alimentaria (Castro *et al.*, 2018).

### ***Evaluación de genes de resistencia antibiótica mecC y mecA en S. aureus de lecherías***

Los antibióticos se usan ampliamente en medicina humana y veterinaria. En la producción lechera de Chile, las terapias de secado que incluyen cloxacilina, podrían causar una presión de selección pulsotipos de *S. aureus* meticilino resistentes, causantes de IMI presentes en la leche de estanque. No obstante, la presente

investigación reporta la ausencia de genes de resistencia a meticilina, *mecA* y *mecC*, entre las cepas de *S. aureus* evaluadas. En concordancia con nuestros resultados, Velasco *et. al.*, (2008) no encontró MRSA en la cadena productiva de carne de cerdo en Chile. Estos resultados contrastan con la alta prevalencia de aislados de *S. aureus* de origen hospitalario en Chile distribuido a nivel nacional (Aguayo-Reyes *et. al.*, 2018; Comunicación personal Mario Quezada, LIAA). La vigilancia de emergencia de cepas de MRSA en producción animal está acorde con lo descrito en Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos del gobierno de Chile decretado el 2017 (<https://diprece.minsal.cl/desarrollo-de-plan-de-resistencia-antimicrobiana/>). Por lo anterior, nuestra investigación se alinea con el plan nacional de vigilancia, aportando el primer reporte en Chile de MRSA en producción lechera.

### ***Futuras propuestas de investigación***

Con la finalidad de seguir caracterizando los pulsotipos de *S. aureus* presentes en adherencias macroscópicas y BTM, y evaluadas en la presente investigación, se propone complementar esta evaluación con la habilidad de adherencia al poliestireno, incluyendo otros materiales del equipo de ordeño tales como silicona, vidrio, y goma. Adicionalmente, futuras investigaciones consideran el complementar el estudio de los factores de virulencia de relevancia en salud pública, aumentando el número de enterotoxinas a evaluar en aislados de leche de estanque. Adicionalmente, el complementar la subtipificación de *S. aureus* de origen intramamario con las muestras de BTM y AMES en las lecherías, como lo realizado puntualmente en la lechería 12, permitiría conocer si existe clonalidad entre cepas.

Existen bastantes antecedentes de la epidemiología de *S. aureus* como agente intramamario, sin embargo poco se conoce sobre su dinámica una vez que el microorganismo es eliminado por la glándula mamaria y su dinámica en la producción láctea. Considerando la importancia de *S. aureus* en la producción de leche y salud pública, como también su habilidad para evolucionar y adaptarse en diferentes ambientes, se propone enfocar nuevos estudios que permitan vincular y conocer la epidemiología de este microorganismo entre animales, AMES, BTM e industria.



## CONCLUSIONES GENERALES

1. Entre lecherías de la región de Ñuble existe alta diversidad de cepas de *S. aureus* con perfil predominante de virulencia de *coa*<sup>(+)</sup> *nuc*<sup>(+)</sup> *fnbA*<sup>(+)</sup> *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup> *seb*<sup>(-)</sup> *mecC*<sup>(-)</sup> *mecA*<sup>(-)</sup> y habilidad de adherencia media a superficies de poliestireno.
2. Dentro de las lecherías de la región de Ñuble, existe una diversidad variable de cepas de *S. aureus* identificadas en leche de estanque y adherencias macroscópicas de superficies en contacto con leche (SID=0 a 1).
3. Adherencias presentes en superficies de equipo de ordeño con *S. aureus* pueden representar una potencial fuente de este microorganismo en la leche de estanque.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguayo-Reyes, A., M. Quezada-Aguiluz, S. Mella, G. Riedel, A. Opazo-Capurro, H. Bello-Toledo, M. Domínguez, and G. González-Rocha. 2018. [Molecular basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*]. Rev Chilena Infectol 35:7–14. doi:10.4067/s0716-10182018000100007.
- Alibayov, B., L. Baba-Moussa, H. Sina, K. Zdeňková, and K. Demnerová. 2014. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. Mol Biol Rep 41:5005–5018. doi:10.1007/s11033-014-3367-3.
- Argudín, M.Á., M.C. Mendoza, and M.R. Rodicio. 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins 2:1751–1773. doi:10.3390/toxins2071751.
- Bentley, S.D., and J. Parkhill. 2015. Genomic perspectives on the evolution and spread of bacterial pathogens. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 282:20150488. doi:10.1098/rspb.2015.0488.
- Barbano, D.M., Y. Ma, and M. V. Santos. 2006. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. J. Dairy Sci. Vol. 89 (E. Suppl.): 15–19.
- Bi, Y., Y.J. Wang, Y. Qin, R.G. Vallverdú, J.M. García, W. Sun, S. Li, and Z. Cao. 2016. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. PLOS ONE 11:e0155621. doi:10.1371/journal.pone.0155621.
- Boss, R., A. Cosandey, M. Luini, K. Artursson, M. Bardiau, F. Breitenwieser, E. Hehenberger, Th. Lam, M. Mansfeld, A. Michel, G. Mösslacher, J. Naskova, S. Nelson, O. Podpečan, A. Raemy, E. Ryan, O. Salat, P. Zangerl, A. Steiner, and

H.U. Graber. 2016. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science* 99:515–528. doi:10.3168/jds.2015-9589.

Castro, A., J. Silva, and P. Teixeira. 2018. Chapter 8 - *Staphylococcus aureus*, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. A.M. Holban and A.M. Grumezescu, ed. *Handbook of Food Bioengineering*. Academic Press.

de Souza da Cunha, M. L. R. 2014. *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Virulence, Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology. Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Biosciences Institute, Univ Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

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* 46:3728–3735. doi:10.1128/JCM.00769-08.

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.

Jett, B.D., and M.S. Gilmore. 2002. Internalization of *Staphylococcus aureus* by Human Corneal Epithelial Cells: Role of Bacterial Fibronectin-Binding Protein and Host Cell Factors. *Infection and Immunity* 70:4697–4700. doi:10.1128/IAI.70.8.4697-4700.2002.

- Lan, X.Y., S.G. Zhao, N. Zheng, S.L. Li, Y.D. Zhang, H.M. Liu, J. McKillip, and J.Q. Wang. 2017. Short communication: Microbiological quality of raw cow milk and its association with herd management practices in Northern China. *Journal of Dairy Science* 100:4294–4299. doi:10.3168/jds.2016-11631.
- Larsen, H.D., F.M. Aarestrup, and N.E. 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* 85:61–67. doi:10.1016/S0378-1135(01)00478-3.
- Latorre, A.A., P.A. Pachá, G. González-Rocha, I. San Martín, M. Quezada-Aguiluz, A. Aguayo-Reyes, H. Bello-Toledo, R. Oliva, A. Estay, J. Pugin, and M.A. Muñoz. 2019. On-Farm Surfaces in Contact with Milk: The Role of *Staphylococcus aureus*-Containing Biofilms for Udder Health and Milk Quality. *Foodborne Pathogens and Disease*. doi:10.1089/fpd.2019.2704.
- Lee, S.H.I., B.L.C. Mangolin, J.L. Gonçalves, D.V. Neeff, M.P. Silva, A.G. Cruz, and C.A.F. Oliveira. 2014. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science* 97:1812–1816. doi:10.3168/jds.2013-7387.
- Mella, A., F. Ulloa, I. Valdés, N. Olivares, A. Ceballos, J. Kruze, A. Mella, F. Ulloa, I. Valdés, N. Olivares, A. Ceballos, and J. Kruze. 2017. Evaluation of a new vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy herds of southern Chile. I. Challenge trial. *Austral journal of veterinary sciences* 49:149–160. doi:10.4067/S0719-81322017000300149.

McMillan, K., S.C. Moore, C.M. McAuley, N. Fegan, and E.M. Fox. 2016.

Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. BMC Microbiology 16:169. doi:10.1186/s12866-016-0789-1.

Munoz, M., C. Acuña, F. Sáez, A. Latorre, and B. León. 2018. Antimicrobial resistance profiles of microorganisms isolated from milk

samples from clinical mastitis and subclinical-infected quarters in dairy herds from Chile.

Pages 184–185 in Proc. Natl. Mastitis Counc. Annu. Meeting, Tucson, AZ.

Natl. Mastitis Counc. Inc., Verona, WI. Pacha, P. 2015. 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. Thesis. Universidad de Concepción . Facultad de Ciencias Veterinarias,.

Parisi, A., Caruso, M., Normanno, G., Latorre, L., Sottili, R., Miccolupo, A., ... & Santagada, G. 2016. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. Food microbiology, 58, 36-42.

Pereyra, E.A.L., F. Picech, M.S. Renna, C. Baravalle, C.S. Andreotti, R. Russi, L.F. Calvino, C. Diez, and B.E. Dallard. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Veterinary Microbiology 183:69–77. doi:10.1016/j.vetmic.2015.12.002.

- Rowe, S.M., S.M. Godden, E. Royster, J. Timmerman, and M. Boyle. 2019. Cross-sectional study of the relationship between cloth udder towel management, towel bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102:11401–11413. doi:10.3168/jds.2019-17075.
- Ruegg, P.L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science* 100:10381–10397. doi:10.3168/jds.2017-13023.
- Said, M.B., M.S. Abbassi, V. Bianchini, S. Sghaier, P. Cremonesi, A. Romanò, V. Gualdi, A. Hassen, and M.V. Luini. 2016. Genetic characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tunisia. *Letters in Applied Microbiology* 63:473–481. doi:10.1111/lam.12672.
- San Martin, B., J. Kruze, M.A. Morales, H. Agüero, B. Leon, S. Espinoza, D. Iragüen, J. Puga, and C. Borie. 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* 34:221–234. doi:10.4067/S0301-732X2002000200008
- Velasco, V., J.L. Vergara, A.M. Bonilla, J. Muñoz, A. Mallea, D. Vallejos, M. Quezada-Aguiluz, J. Campos, and P. Rojas-García. 2018. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains in the Pork Chain Supply in Chile. *Foodborne Pathogens and Disease* 15:262–268. doi:10.1089/fpd.2017.2381.

Zadoks, R.N., W.B. van Leeuwen, D. Kreft, L.K. Fox, H.W. Barkema, Y.H. 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* 40:3894–3902. doi:10.1128/JCM.40.11.3894-3902.2002.

Zadoks, R.N., J.R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm, and Y.H. Schukken. 2011. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:357–372. doi:10.1007/s10911-011-9236-y.

Zeaki, N., Y. Budi Susilo, A. Pregiel, P. Rådström, and J. Schelin. 2015. Prophage-Encoded Staphylococcal Enterotoxin A: Regulation of Production in *Staphylococcus aureus* Strains Representing Different Sea Regions. *Toxins* 7:5359–5376. doi:10.3390/toxins7124889.

## CAPITULO 6. ANEXOS

### ANEXO 1.

**Listado detallado de origen de aislados de *S. aureus* y su clasificación acorde a su pulstotipo principal, pulstotipo y perfil de virulencia.** Fuente: Elaboración Propia.

Pulstotipo Principal	Pulstotipos totales	Pulstotipo y Perfil de virulencia <sup>1</sup>	<i>Granja</i>	LCL ID	Origen	Procedencia	BTM
A	A	A_PV1	<b>1</b>	L1-010	BTM	BTM	M1
A	A	A_PV1	<b>2</b>	L1-085	BTM	BTM	M2
A	A	A_PV1	<b>2</b>	L1-048	SP	MLM	
A	A.1	A.1_PV1	<b>1</b>	L1-080	BTM	BTM	M3
A	A.1	A.1_PV1	<b>7</b>	L1-181	BTM	BTM	M2
A	A.1	A.1_PV1	<b>7</b>	L1-182	BTM	BTM	M3
A	A.2	A.2_PV1	<b>2</b>	L1-083	BTM	BTM	M2
A	A.3	A.3_PV1	<b>6</b>	L1-134	BTM	BTM	M2
B	B	B_PV1	<b>16</b>	L1-554	BTM	BTM	M1
B	B	B_PV1	<b>16</b>	L1-556	BTM	BTM	M2
B	B	B_PV1	<b>16</b>	L1-558	BTM	BTM	M3
B	B	B_PV1	<b>16</b>	L1-1067	SP	L	L2 2.5
B	B	B_PV2	<b>16</b>	L1-557	BTM	BTM	M2
B	B	B_PV2	<b>16</b>	L1-559	BTM	BTM	M3
B	B	B_PV2	<b>16</b>	L1-1062	SP	L	L1 2.5
B	B	B_PV2	<b>16</b>	L1-1063	SP	L	L1 2.5
B	B	B_PV2	<b>16</b>	L1-1066	SP	L	L2 2.5
B	B	B_PV2	<b>16</b>	L1-1029	SP	L	L 2.5

B	B.1	B.1_PV1	16	L1-553	BTM	BTM	M1
B	B.1	B.1_PV1	28	L1-1101	BTM	BTM	M3
B	B.1	B.1_PV1	28	L1-1112	BTM	BTM	M3
B	B.1	B.1_PV2	16	L1-1027	SP	L	L60
B	B.1	B.1_PV2	16	L1-1082	SP	L	L60
B	B.1.2	B.1.2_PV1	28	L1-1110	BTM	BTM	M3
B	B.1.3	B.1.3_PV5	28	L1-1095	BTM	BTM	M2
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1114	BTM	BTM	M1
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1115	BTM	BTM	M1
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1142	BTM	BTM	M2
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1144	BTM	BTM	M2
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1145	BTM	BTM	M3
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1146	BTM	BTM	M3
B	B.2	B.2_PV1	29	L1-1147	BTM	BTM	M3
C	C	C_PV4	1	L1-033	SP	JL	
C	C	C_PV2	1	L1-009	BTM	BTM	M1
C	C	C_PV2	1	L1-079	BTM	BTM	M2
C	C	C_PV2	1	L1-031	SP	JL	
D	D	D_PV1	1	L1-036	SP	MLM	
D	D	D_PV1	9	L1-222	BTM	BTM	M1
D	D	D_PV1	10	L1-201	BTM	BTM	M1
D	D	D_PV1	10	L1-202	BTM	BTM	M1
D	D	D_PV1	10	L1-204	BTM	BTM	M3
D	D	D_PV1	10	L1-327	SP	C	
D	D	D_PV1	10	L1-257	SP	ET1	
D	D	D_PV1	10	L1-421	SP	ML	

D	D	D_PV2	1	L1-001	SP	MLM	
D	D	D_PV2	9	L1-195	BTM	BTM	M2
D	D	D_PV2	9	L1-197	BTM	BTM	M3
D	D	D_PV2	10	L1-203	BTM	BTM	M2
D	D	D_PV2	10	L1-326	SP	C	
D	D	D_PV2	10	L1-372	SP	ET1	
D	D	D_PV2	10	L1-416	SP	ML	
E	E	E_PV1	5	L1-130	BTM	BTM	M1
E	E	E_PV1	5	L1-131	BTM	BTM	M2
E	E	E_PV1	5	L1-137	BTM	BTM	M2
E	E	E_PV1	6	L1-135	BTM	BTM	M3
E	E	E_PV1	6	L1-142	BTM	BTM	M3
E	E	E_PV1	12	L1-317	SP	ENT1	
E	E	E_PV1	12	L1-451	SP	ENT1	1
E	E	E_PV2	6	L1-140	BTM	BTM	M3
E	E.1	E.1_PV1	12	L1-438	SP	VC	3
E	E.1	E.1_PV1	12	L1-254	BTM	BTM	M3
E	E.1	E.1_PV2	12	L1-274	BTM	BTM	M1
E	E.11	E.11_PV1	14	L1-483	BTM	BTM	M1
E	E.11	E.11_PV1	14	L1-484	BTM	BTM	M1
E	E.11	E.11_PV1	14	L1-485	BTM	BTM	M2
E	E.11	E.11_PV1	14	L1-486	BTM	BTM	M2
E	E.11	E.11_PV1	14	L1-480	BTM	BTM	M3
E	E.11	E.11_PV1	14	L1-482	BTM	BTM	M3
F	F	F_PV1	17	L1-625	BTM	BTM	M1
F	F	F_PV1	17	L1-627	BTM	BTM	M2

F	F.1	F.1_PV1	17	L1-630	BTM	BTM	M2
F	F.1	F.1_PV1	17	L1-616	BTM	BTM	M3
F	F.1	F.1_PV1	17	L1-617	BTM	BTM	M3
F	F.1	F.1_PV1	17	L1-618	BTM	BTM	M3
F	F.12	F.12_PV2	11	L1-279	BTM	BTM	M2
G	G	G_PV1	19	L1-651	BTM	BTM	M1
G	G	G_PV1	19	<b>L1-652</b>	<b>BTM</b>	<b>BTM</b>	<b>M1</b>
G	G	G_PV1	19	L1-653	BTM	BTM	M1
G	G	G_PV1	19	L1-654	BTM	BTM	M2
G	G	G_PV1	19	L1-655	BTM	BTM	M2
G	G	G_PV1	19	L1-656	BTM	BTM	M2
G	G	G_PV1	19	L1-657	BTM	BTM	M3
G	G	G_PV1	19	L1-658	BTM	BTM	M3
G	G	G_PV1	19	L1-659	BTM	BTM	M3
G	G	G_PV1	19	L1-622	SP	ENT1	1
G	G	G_PV1	19	L1-623	SP	ENT2	2
G	G	G_PV1	19	L1-624	SP	EST1	1
H	H	H_PV1	12	<b>L1-458</b>	SP	PEZ	TD
H	H	H_PV1	12	L1-285	BTM	BTM	M2
H	H	H_PV1	12	L1-278	BTM	BTM	M2
H	H	H_PV1	12	L1-422	SP	ENT3	3
H	H	H_PV1	12	L1-423	SP	ENT3	3
H	H	H_PV1	12	L1-456	SP	PEZ	DD
H	H	H_PV1	12	L1-457	SP	PEZ	DD
H	H	H_PV1	12	L1-462	SP	PEZ	TI
H	H	H_PV1	12	L1-463	SP	PEZ	TI

I	I	I_PV1	12	L1-277	BTM	BTM	M2
I	I	I_PV1	12	L1-450	SP	ENT2	2
I	I	I_PV1	12	L1-442	SP	MLM	3
I	I	I_PV1	12	L1-461	SP	PEZ	DI
I	I.2	I.2_PV1	28	L1-1109	BTM	BTM	M2
J	J	J_PV1	12	L1-324	SP	AE	
J	J	J_PV1	12	L1-441	SP	MLM	3
J	J	J_PV1	12	L1-460	SP	PEZ	DI
J	J	J_PV1	12	L1-255	BTM	BTM	M3
J	J	J_PV1	12	L1-430	SP	AE	
J	J	J_PV1	12	L1-318	SP	ENT2	2
J	J	J_PV1	12	L1-433	SP	ET3	3
J	J	J_PV1	12	L1-435	SP	ET3	3
J	J	J_PV1	12	L1-323	SP	OI	
J	J	J_PV1	12	L1-447	SP	OI	C5
J	J	J_PV1	12	L1-459	SP	PEZ	TD
J	J	J_PV1	12	L1-427	SP	TC PEZ	TC DD
J	J	J_PV1	12	L1-428	SP	TC PEZ	TC DD
J	J	J_PV1	18	L1-645	BTM	BTM	M3
J	J	J_PV2	12	L1-275	BTM	BTM	M1
J	J	J_PV2	12	L1-276	BTM	BTM	M1
K	K	K_PV1	5	L1-138	BTM	BTM	M2
K	K	K_PV1	5	L1-132	BTM	BTM	M3
K	K	K_PV1	12	L1-439	SP	VC	3
K	K	K_PV3	11	L1-271	BTM	BTM	M2
K	K.1	K.1_PV1	12	L1-314	SP	OE	

K	K.1	K.1_PV1	<b>12</b>	L1-286	BTM	BTM	M3
K	K.2	K.2_PV1	<b>12</b>	L1-453	SP	OE	C3
L	L	L_PV3	<b>11</b>	L1-270	BTM	BTM	M1
L	L	L_PV3	<b>11</b>	L1-272	BTM	BTM	M2
M	M	M_PV1	<b>6</b>	L1-133	BTM	BTM	M1
N	N	N_PV1	<b>6</b>	L1-139	BTM	BTM	M1
N	N	N_PV1	<b>18</b>	L1-644	BTM	BTM	M3
O	O	O.1_PV2	<b>9</b>	L1-193	BTM	BTM	M1
O	O	O.1_PV4	<b>9</b>	<b>L1-224</b>	<b>BTM</b>	<b>BTM</b>	<b>M2</b>
O	O.1	O.1_PV1	<b>9</b>	L1-198	BTM	BTM	M3
P	P	P_PV2	<b>15</b>	L1-534	BTM	BTM	M1
P	P.2	P.2_PV1	<b>28</b>	L1-1207	SP	TJ	2
P	P.2	P.2_PV1	<b>28</b>	L1-1210	SP	TJ	2
Q	Q	Q_PV1	<b>4</b>	L1-128	BTM	BTM	M1
Q	Q	Q_PV1	<b>4</b>	L1-126	BTM	BTM	M2
Q	Q	Q_PV1	<b>18</b>	L1 638	BTM	BTM	M1
Q	Q	Q_PV1	<b>18</b>	L1-641	BTM	BTM	M2
Q	Q	Q_PV1	<b>18</b>	<b>L1-642</b>	<b>BTM</b>	<b>BTM</b>	<b>M2</b>
Q	Q	Q_PV1	<b>18</b>	L1-643	BTM	BTM	M2
Q	Q.1	Q.1_PV1	<b>18</b>	<b>L1-639</b>	<b>BTM</b>	<b>BTM</b>	<b>M1</b>
Q	Q.1	Q.1_PV1	<b>18</b>	L1-640	BTM	BTM	M1
R	R	R_PV2	<b>20</b>	L1-661	BTM	BTM	M1
R	R	R_PV2	<b>20</b>	L1-662	BTM	BTM	M1
R	R	R_PV2	<b>20</b>	L1-663	BTM	BTM	M2
R	R	R_PV2	<b>20</b>	L1-664	BTM	BTM	M2
S	S	S_PV1	<b>20</b>	L1-665	BTM	BTM	M3

T	T	T_PV1	<b>21</b>	L1-746	BTM	BTM	M2
T	T	T_PV1	<b>21</b>	L1-747	BTM	BTM	M2
T	T	T_PV1	<b>21</b>	L1-748	BTM	BTM	M3
T	T	T_PV1	<b>21</b>	L1-749	BTM	BTM	M3
T	T	T_PV1	<b>21</b>	<b>L1-750</b>	<b>BTM</b>	<b>BTM</b>	<b>M3</b>
U	U	U_PV1	<b>23</b>	L1-887	BTM	BTM	M1
U	U	U_PV1	<b>23</b>	L1-888	BTM	BTM	M1
U	U	U_PV1	<b>23</b>	L1-889	BTM	BTM	M2
U	U	U_PV1	<b>23</b>	L1-894	BTM	BTM	M3
V	V	V_PV1	<b>27</b>	L1-1030	BTM	BTM	M1
V	V.1	V.1_PV1	<b>27</b>	L1-1032	BTM	BTM	M1
W	W	W_PV1	<b>30</b>	L1-1149	BTM	BTM	M1
W	W	W_PV1	<b>30</b>	L1-1155	BTM	BTM	M2
W	W	W_PV1	<b>30</b>	L1-1156	BTM	BTM	M3
W	W	W_PV1	<b>30</b>	L1-1169	SP	C	1
W	W	W_PV1	<b>30</b>	L1-1170	SP	C	1
W	W.2	W.2_PV1	<b>30</b>	L1-1152	BTM	BTM	M1
W	W.2	W.2_PV1	<b>30</b>	L1-1154	BTM	BTM	M2

BTM: leche de estanque, M1, M2, M3: Muestra 1, 2 y 3 respectivamente; SP: superficie; C: colector; PEZ: pezonera; L: Línea de leche; MLM: Manguera de leche mastítica, JL: Jarra de leche; VC: válvula del colector, ENT: entrada de tarro; AE: Aspa de estanque, OI: Outlet interno de estanque, TJ: Tapa de jarra de leche; <sup>1</sup> Todos los aislados son *coa*<sup>(+)</sup> *nuc*<sup>(+)</sup> *fnbA*<sup>(+)</sup> *seb*<sup>(-)</sup> *mecA*<sup>(-)</sup> and *mecC*<sup>(-)</sup>. PV1: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV2: *icaA*<sup>(-)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV3: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(+)</sup> *sea*<sup>(+)</sup>; PV4: *icaA*<sup>(-)</sup> *icaD*<sup>(-)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>; PV5: *icaA*<sup>(+)</sup> *icaD*<sup>(-)</sup> *sea*<sup>(-)</sup>.

## ANEXO.2.

**Dendograma de aislados de *S. aureus* por granja lechera.(Granja 1 a 30).** Letras A-W: Pulsotipo asignado por inspección visual; L1-XXX/ LM-XXX/ E-XXXX: corresponde al ID del aislado, G: Granja, AMES: Superficies con adherencias macroscópicas, BTM 1, 2, 3: Muestras de Leche estanque 1, 2 y 3 respectivamente; MQ: leche de cuarto. Fuente: Elaboración Propia.

Lechería 1



Lechería 2



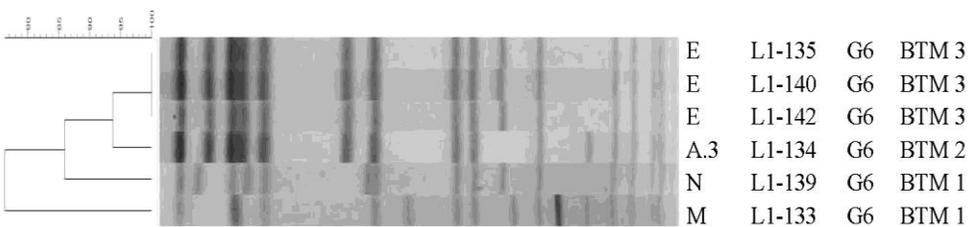
Lechería 4



Lechería 5



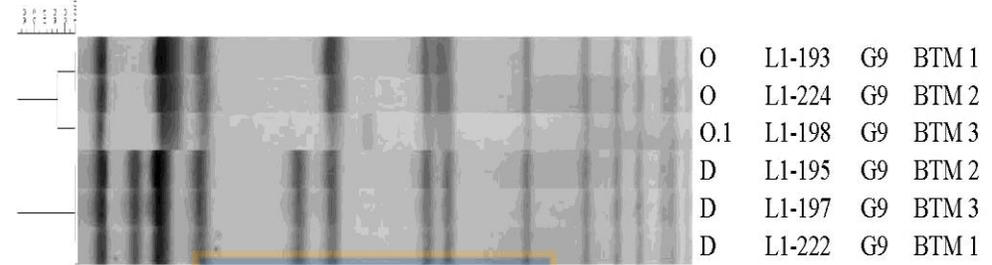
Lechería 6



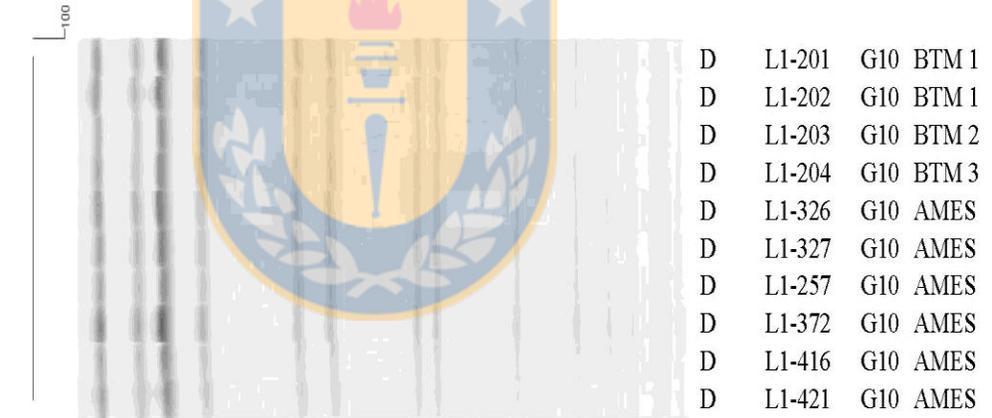
Lechería 7



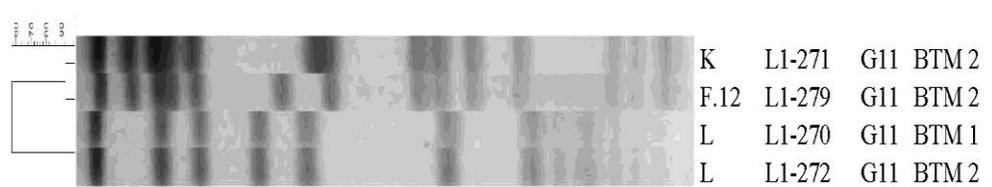
Lechería 9



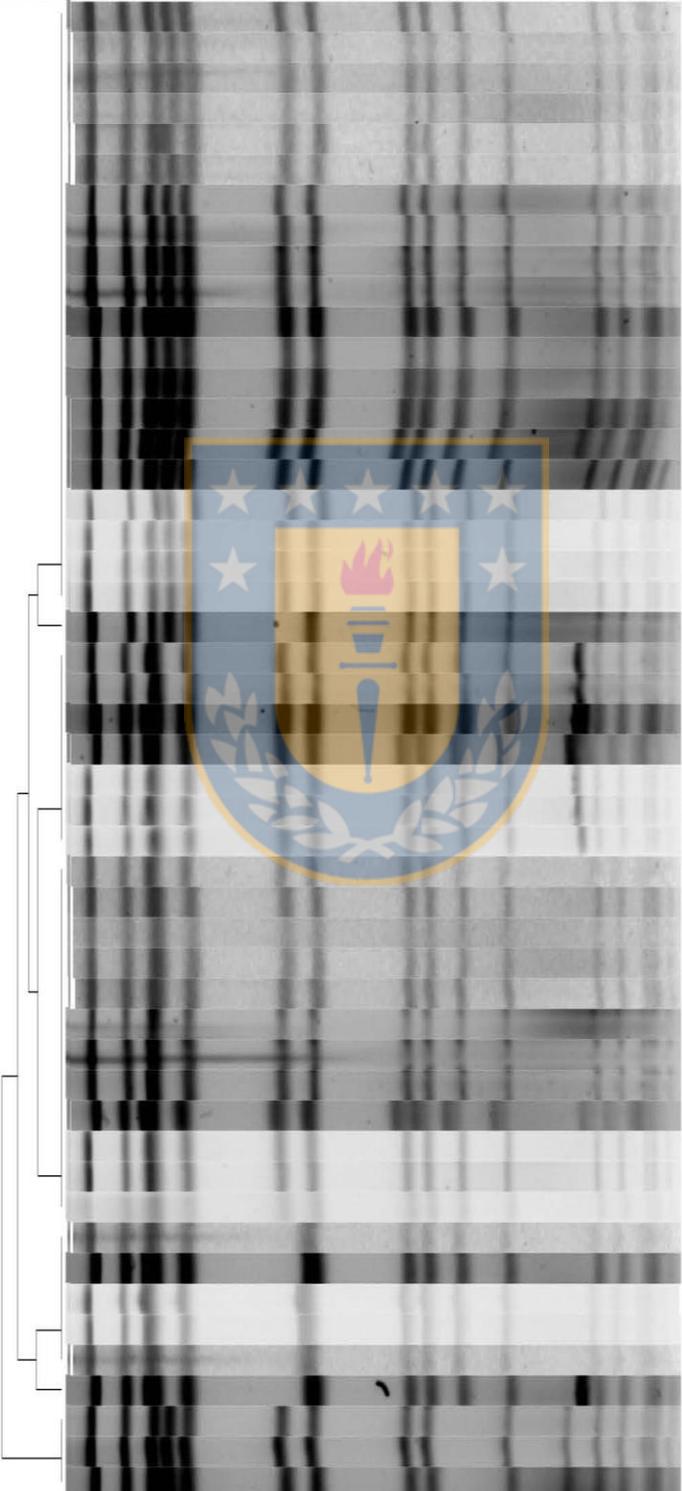
Lechería 10



Lechería 11



Lecheria 12



J	L1-275	G12	BTM 1
J	L1-324	G12	AMES
J	L1-459	G12	AMES
J	L1-427	G12	AMES
E	L1-451	G12	AMES
J	L1-318	G12	AMES
J	L1-276	G12	BTM 1
J	L1-255	G12	BTM 3
J	L1-460	G12	AMES
J	L1-428	G12	AMES
J	L1-441	G12	AMES
J	L1-323	G12	AMES
J	L1-447	G12	AMES
J	L1-430	G12	AMES
J	L1-433	G12	AMES
J	L1-435	G12	AMES
E	L1-317	G12	AMES
J	E1-007	G12	LM
J	LM-056	G12	LM
J	LM-064	G12	LM
K	L1-439	G12	AMES
I	L1-277	G12	BTM 2
I	L1-461	G12	AMES
I	L1-442	G12	AMES
I	L1-450	G12	AMES
I	LM-054	G12	LM
I	LM-058	G12	LM
I	LM-061	G12	LM
H	L1-285	G12	BTM 2
H	L1-458	G12	AMES
H	L1-457	G12	AMES
H	L1-463	G12	AMES
H	L1-423	G12	AMES
H	L1-278	G12	BTM 2
H	L1-456	G12	AMES
H	L1-462	G12	AMES
H	L1-422	G12	AMES
H	LM-059	G12	LM
H	LM-060	G12	LM
H	E1-018	G12	LM
K.1	L1-286	G12	BTM 3
K.1	L1-314	G12	AMES
K.1	E1-003	G12	LM
K.1	E1-004	G12	LM
K.1	L1-286	G12	BTM 3
K.2	L1-453	G12	AMES
E	L1-254	G12	BTM 3
E	L1-274	G12	BTM 1
E	L1-438	G12	AMES

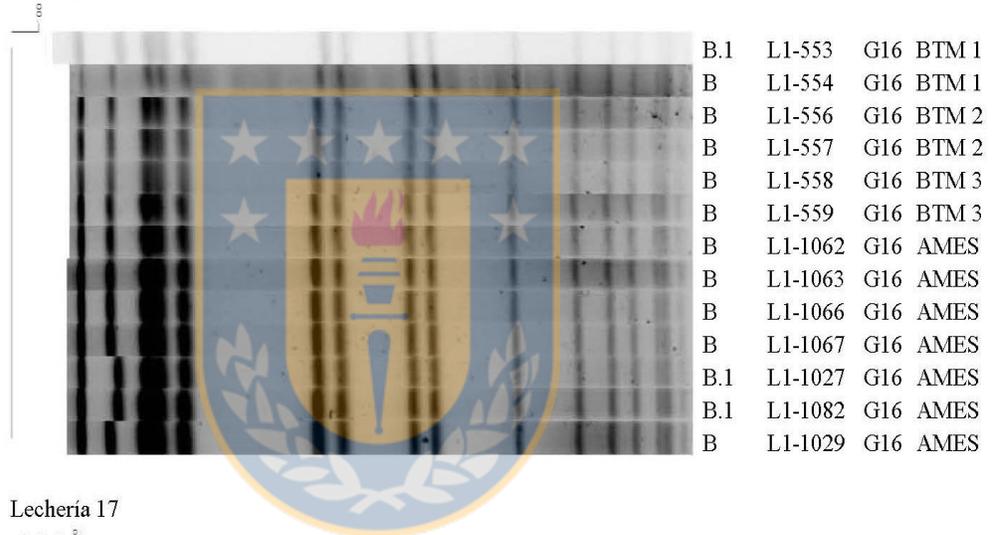
Lechería 14



Lechería 15



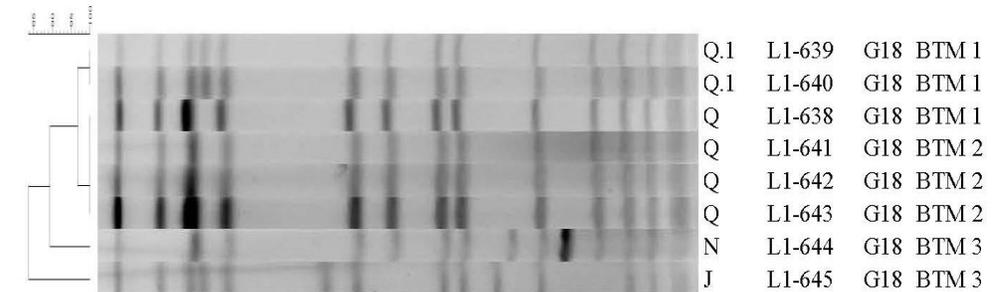
Lechería 16



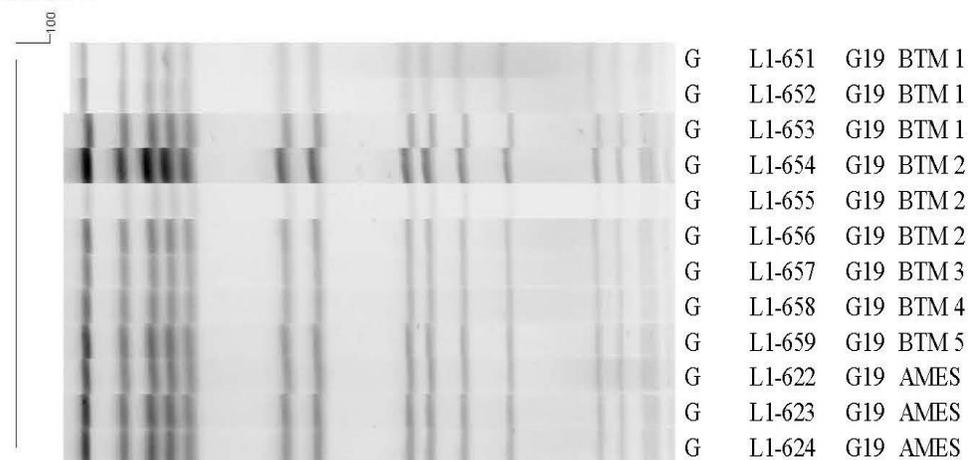
Lechería 17



Lechería 18



Lechería 19



Lechería 20



Lechería 21



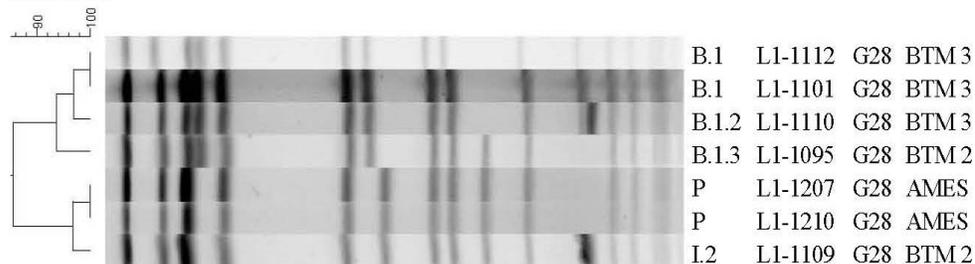
Lechería 23



Lechería 27



Lechería 28



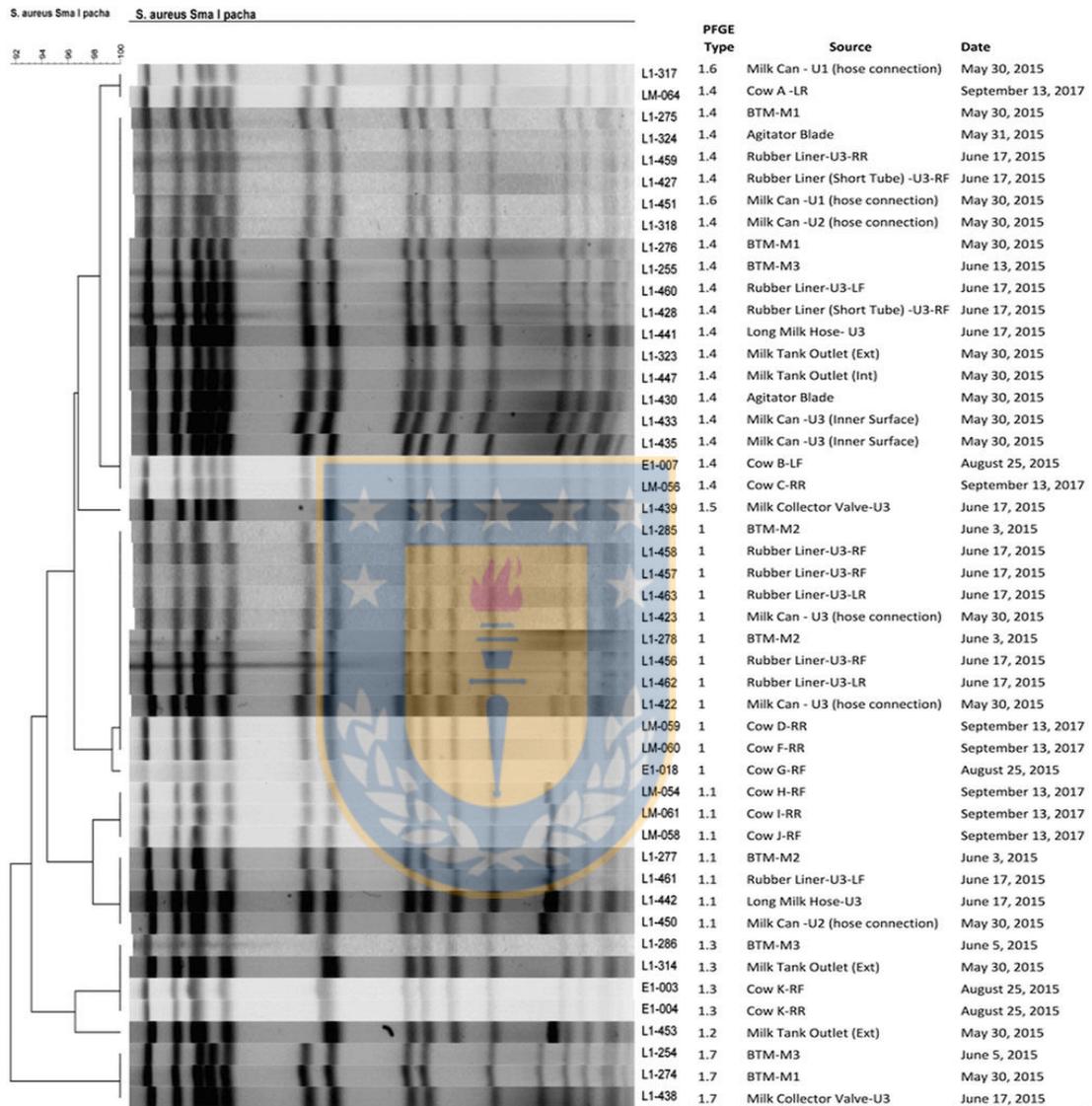
Lechería 29



Lechería 30

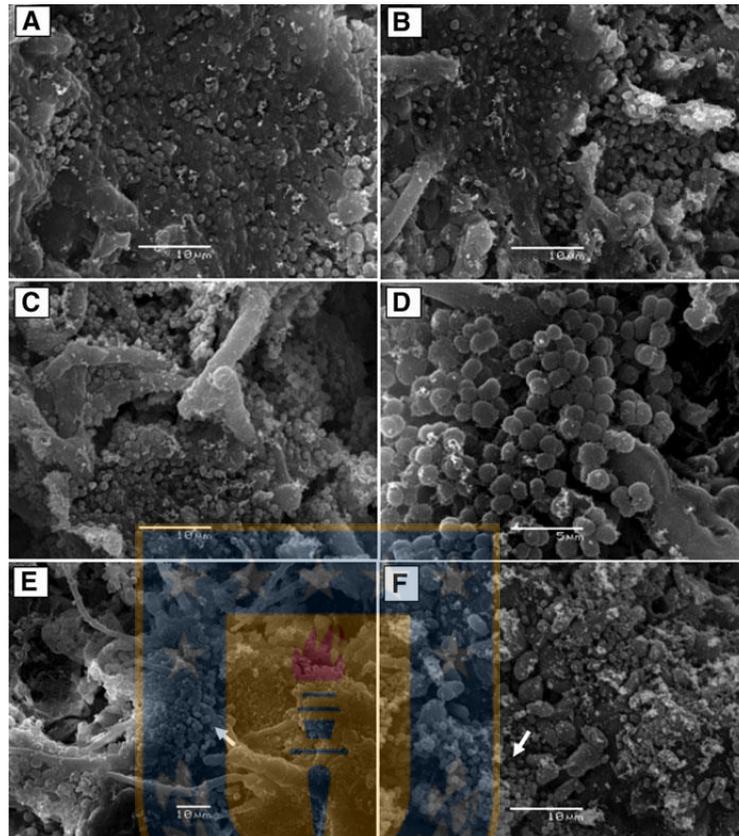


## ANEXO 3

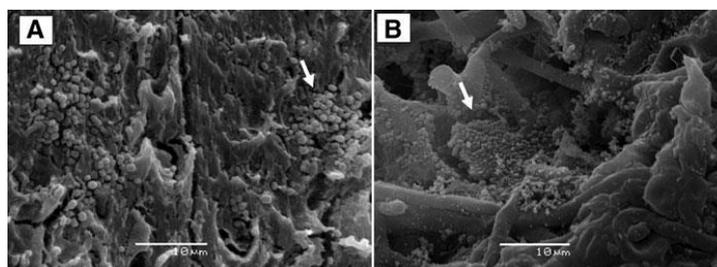


**Anexo 3.** Figura extraída de Latorre *et al.*, 2020. Dendrograma de aislados de *S. aureus* obtenidos desde muestras de leche de estanque (BTM), equipo de ordeño, y vacas individuales en un estudio de granja. El dendrograma esta basado en el análisis de perfiles de ADN digeridos por SmaI utilizando un corte de 100%. Los tipos de PFGE fueron asignados por inspección visual de dos observadores independientes de los perfiles de ADN digeridos por SmaI mostrados a la derecha del dendrograma, seguido por la fuente de la muestra, y fecha de muestreo. U= posición de unidad de ordeño de la lechería; LF, LR, RF, and RR = cuarto anterior derecho, posterior derecho, delantero derecho, y trasero derecho, respectivamente; BTM= leche de estanque; M1, M2, o M3= muestra de leche consecutiva 1, 2, o 3, respectivamente; Ext = área externa de salida de estanque de leche (conexión con manguera de camión); Int = área interna de salida de estanque de leche (porción de estanque de leche); PFGE=elcetroforesis en gel de campo pulsado. (Información corresponde a lechería 12; equivalencias de pulsotipos con tesis. 1=H; 1.1=I; 1.2=K.2; 1.3= K.1; 1.4=J; 1.5= K; 1.6= E; 1.7=E.1). Fuente: Latorre *et al.*, 2020.

#### ANEXO. 4



**Anexo 4.1.** Figura 1 de artículo de Latorre *et al.*, 2020. Imagen de microscopía electrónica de biopelículas en la superficie de pezonera de goma. (A–C) Bacteria cocáceas contenida en biopelículas en el cuerpo de pezonera. (D, E). Biopelícula en tubo corto y, (F) biopelícula en boquilla. Flechas muestran bacterias cocáceas dentro de una biopelícula multispecie. (Pulsotipos de tesis doctoral identificados en lechería 12 desde pezoneras: H, I, J; ). Fuente: Latorre *et al.*, 2020.



**Anexo 4.2.** Figura 2 de artículo de Latorre *et al.*, 2020. Imagen de microscopía electrónica de biopelícula en la superficie de (A) manguera de leche y (B) válvula del colector. Flechas muestran bacterias cocáceas dentro de una biopelícula multispecie. (Pulsotipos de tesis doctoral identificados en lechería 12 desde manguera de leche: I, J; válvula del colector: K, E.1). Fuente: Latorre *et al.*, 2020.

## ANEXO 5. LISTADO ABREVIACIONES

AMES	Adherencias macroscópicas en superficies de equipo de ordeño ( <i>Macroscopic adherences on milking equipment surfaces</i> )
BHI	Caldo cerebro corazón ( <i>Brain hearth infusión broth</i> )
BHIA	Agar cerebro corazón ( <i>Brain hearth infusión agar</i> )
BTM	Leche de estanque, leche de tanque ( <i>Bulk tank milk</i> )
IMI	Infecciones intramamarias ( <i>Intramammary infections</i> )
MPA	Ensayo de adherencia en microplacas ( <i>Microtitter Plate Assay</i> )
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente ( <i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> )
NMC	Consejo Nacional de las Mastitis de los Estados Unidos ( <i>National Mastitis Council</i> )
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado ( <i>Pulsed Field Gel electrophoresis</i> )
PV	Perfil de Virulencia
RCS	Recuento Celular Somático.
SID	Índice de diversidad de Simpson ( <i>Simpson index diversity</i> ).

ANEXO 6. COPYRIGHT RELEASE JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, ARTÍCULO  
CAPITULO 3



JOURNAL OF DAIRY SCIENCE

1800 South Oak St. STE 100, Champaign, IL 61820

FAX: 217.378.4083

[journals@assochnq.org](mailto:journals@assochnq.org)

**Editor-in-Chief**  
Paul Kononoff  
University of Nebraska  
[pkononoff2@unl.edu](mailto:pkononoff2@unl.edu)

**Managing Editor**  
Susan M. Pollock  
FASS, ADSA  
217.356.7641  
[susanp@assochnq.org](mailto:susanp@assochnq.org)

**Lead Technical Editor**  
Louise R. Adam  
FASS, ADSA  
217.239.3340  
[loua@assochnq.org](mailto:loua@assochnq.org)

April 22, 2020

Paulina Pacha Becerra, MV, MCs, DCs(c)  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción  
Campus Chillán  
Avenida Vicente Méndez 595  
Chillán, Chile

Dear Paulina Pacha Becerra:

The *Journal of Dairy Science* grants you nonexclusive permission to print the article listed below in your dissertation, provided that appropriate credit is given to the original publication in the journal. Authors typically use a statement along the lines of "Used by permission of the American Dairy Science Association" and include identifying citation information; the DOI is included for this purpose. The journal acknowledges that your dissertation may be deposited into a repository and requires that a link to the original journal article is included and that the article will not be sold or displayed separately from the dissertation.

Pacha PA, Munoz MA, Paredes-Osses E, Latorre AA. Virulence profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk and adherences on milking equipment on Chilean dairy farms. *J. Dairy Sci.* 2020;103:4732–4737.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17794>

Best regards,

*Susan Pollock*  
Susan Pollock  
JDS Managing Editor