



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias con Mención en Calidad e
Inocuidad de Alimentos de Origen Animal

**EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus EN MATERIALES DE USO FRECUENTE
EN EQUIPOS DE ORDEÑO EN LECHERÍAS**

Tesis para optar a grado de Magíster en Ciencias Veterinarias con Mención en
Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal

CAMILA ANDREA MEDINA MIRANDA
CHILLÁN - CHILE
2024

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

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

Profesor Guía

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

Comisión Evaluadora:

Dr. Danny Fuentes Castillo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Diego Manríquez Álvarez
AgNext, Department of Animal Science
Colorado State University

Director de Postgrado

Dr. Fidel O. Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDOS

| CAPÍTULO | PÁGINA |
|-------------------------------------|---------------|
| RESUMEN..... | vii |
| SUMMARY..... | ix |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. MATERIALES Y MÉTODO..... | 15 |
| III. RESULTADOS..... | 24 |
| IV. DISCUSIÓN..... | 36 |
| V. CONCLUSIONES..... | 43 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 44 |

INDICE DE TABLAS

| TABLA N.º | | PÁGINA |
|-----------|--|--------|
| | En el texto | |
| 1. | Factores de virulencia y mecanismo de acción descritos para <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 |
| 2. | Genes codificantes de <i>Staphylococcus aureus</i> que codifican para proteínas asociadas a la formación y establecimiento de biopelículas..... | 12 |
| 3 | Estadística descriptiva de la habilidad de adherencia (UFC/mL) de 3 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> clasificadas con alta, mediana y baja adherencia en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N considerando todos los resultados experimentales..... | 25 |
| 4 | Estadística descriptiva de la habilidad de adherencia (UFC/mL) de 3 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> clasificadas con alta, mediana y baja adherencia en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N después de la remoción de valores experimentales outliers..... | 27 |
| 5 | Diferencias significativas en formación de biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> de alta, mediana y baja adherencia en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N..... | 28 |
| 6 | Diferencias significativas en formación de biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> de alta, mediana y baja adherencia (excluyendo ensayo con datos outliers) en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio | |

| | | |
|---|---|----|
| | borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N. | 29 |
| 7 | Comparación de habilidad de adherencia entre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> para distintos materiales con el total de datos..... | 31 |
| 8 | Comparación de habilidad de adherencia entre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> para distintos materiales después de la exclusión de datos outliers..... | 33 |

INDICE DE FIGURAS

| FIGURA N.º | PÁGINA |
|---|--------|
| En el texto | |
| 1. Biorreactor de biopelícula CDC (CBR). Fuente: CDC Biofilm Reactor (CBR) Operator's manual..... | 18 |
| 2. Imagen de <i>Staphylococcus aureus</i> adheridas a superficies, de forma aislada y en biopelículas formadas <i>in-vitro</i> en la superficie de cupones de PVC (A), goma EPDM (B), acero 316 (C), vidrio borosilicato (D), silicona (E), acero 304 (F), policarbonato (G) y goma Buna-N (H, I, J)..... | 35 |

RESUMEN

EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EN MATERIALES DE USO FRECUENTE EN EQUIPOS DE ORDEÑO EN LECHERÍAS

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un microorganismo patógeno de gran relevancia causante de infecciones intramamarias (IMI) en rebaños lecheros. Las IMI generan un detrimento en la calidad microbiológica y organoléptica de leche. La leche puede contaminarse con *S. aureus* al tener contacto con superficies que tengan presencia de adherencias bacterianas facilitadas por la formación de biopelículas en las superficies en contacto con la leche durante los procesos de ordeño, enfriamiento, y transporte. Las biopelículas pueden proveer bacterias viables en el equipo de ordeño, generando reservorios dentro de las granjas lecheras. Estos reservorios facilitan la permanencia de *S. aureus* y la potencial contaminación de la leche con toxinas estafilocócicas, causales de intoxicaciones alimentarias. El objetivo de esta investigación es comparar la capacidad de adherencia de 3 cepas de *S. aureus* obtenidas desde biopelículas en equipos de ordeño en granjas lecheras ubicadas en la Región de Ñuble. Se crearon biopelículas *in vitro* en superficies de cupones de PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N en un reactor CDC con flujo continuo por 96 horas. Se observó la

formación de biopelículas por las cepas de *S. aureus* en la superficie de los 8 materiales estudiados en imágenes de microscopía electrónica (SEM). Adicionalmente se realizaron recuentos microbianos para evaluar la densidad bacteriana adherida. La evaluación de las diferencias en UFC/mL entre cepas y entre materiales mediante ANOVA presentaron una mayor capacidad de formación de biopelículas en los materiales de tipo goma. Las cepas de alta (L1-1171), media (L1-030) y baja (L1-256) capacidad de adherencia exhibieron un comportamiento similar en la goma Buna-N. Sin embargo, para la goma EPDM la cepa L1-1171 (altamente adherente) tuvo una formación de biopelícula significativamente mayor ($p < 0,0001$). La presente investigación señala que cepas de *S. aureus* presentes en adherencias macroscópicas en las superficies de equipo de ordeño podrían suponer un riesgo a la calidad microbiológica de la leche. Destacando la importancia del recambio correspondiente de piezas del equipo de ordeño, como estrategia de control de este patógeno intramamario y potencial patógeno humano.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, calidad de leche, capacidad de adherencia, biopelícula, lechería.

SUMMARY

EVALUATION OF THE ADHERENCE CAPACITY OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ON MATERIALS FREQUENTLY USED ON MILKING EQUIPMENT IN DAIRY FACILITIES

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the main pathogenic microorganisms causing intramammary infections (IMI) in dairy herds. IMI cause a detriment to the microbiological and organoleptic quality of milk. Milk can become contaminated with *S. aureus* when it comes in contact with surfaces that have bacterial adhesions facilitated by the formation of biofilms on surfaces in contact with milk during milking, cooling and transport processes. Biofilms can provide viable bacteria on milking equipment, generating reservoirs within dairy farms. These reservoirs facilitate the residence of *S. aureus* and the possible contamination of milk with staphylococcal toxins, causing food poisoning. The objective of this research is to compare the adherence capacity of 3 strains of *S. aureus* obtained from biofilms on milking equipment in dairy farms located in the Ñuble Region of Chile. Biofilms were generated *in vitro* on surfaces of PVC coupons, EPDM rubber, electro-polished 316 steel, borosilicate glass, silicone, 304 steel, polycarbonate and Buna-N rubber in a CDC reactor with continuous flow for 96 hours. Biofilm formation by *S. aureus* strains on the surface of the 8 materials studied was observed in electron microscopy (SEM) images. Additionally,

microbial counts were performed to evaluate the adhered bacterial density. The evaluation of the differences in CFU/mL between strains and between materials by ANOVA showed a greater capacity for biofilm formation in the rubber-type materials. Strains with high (L1-1171), medium (L1-030) and low (L1-256) adherence capacity exhibited similar behavior on Buna-N rubber. However, for EPDM rubber strain L1-1171 (highly adherent) had significantly higher biofilm formation ($p < 0.0001$). This study indicates that *S. aureus* strains present in macroscopic adhesions on milking equipment surfaces could pose a risk to the microbiological quality of milk. Emphasizing the importance of the corresponding replacement of milking equipment parts as a control strategy for this intramammary pathogen and potential human pathogen.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, milk quality, adherence capacity, biofilm, dairy.

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un microorganismo patógeno de gran relevancia causante de infecciones intramamarias (IMI) en rebaños lecheros. Las IMI asociadas a *S. aureus* se han reportado a lo largo de las lecherías del mundo, incluyendo lecherías chilenas (Blignaut et al., 2018; Muñoz et al., 2018; Liu et al., 2020). Como patógeno, *S. aureus* es de tipo infeccioso y perpetúa su transmisión en el rebaño por medio del contagio entre vaca a vaca durante la ordeña (Monistero et al., 2018). Este tipo de contagio postula que *S. aureus* proviene únicamente de la glándula mamaria, afectando la calidad de la ubre y de la leche producida. De este modo, tras ingresar a través del canal del pezón, *S. aureus* llega hasta los alveolos glandulares colonizando el tejido epitelial glandular de la ubre. Posteriormente genera daño a nivel alveolar resultando en la alteración de la permeabilidad vascular de la ubre, gatillando la respuesta inmune innata del hospedero (Petzl et al., 2018).

El establecimiento de *S. aureus* en la superficie de elementos presentes durante la ordeña puede originarse producto de fallas en protocolos de higienización. Así, fallas en la higiene del personal, equipo de ordeño e instalaciones permiten el desarrollo de fuentes y reservorios de biopelículas (Latorre et al., 2010). Una biopelícula es una asociación altamente estructurada de bacterias unidas como

conjunto por una matriz extracelular en base a polisacáridos, proteínas y lípidos. Tal asociación forma una matriz extracelular que protege a las colonias bacterianas que la conforman de noxas provenientes del medio ambiente (Limoli et al., 2015). *S. aureus* es una bacteria Gram positiva productora de biopelículas, debido a la codificación de factores virulencia como proteínas de superficie unidas al peptidoglicano de su pared celular. Tales proteínas de superficie asisten en la fase de adhesión a superficies y células, en conjunto a la formación de biopelículas (Foster et al., 2014). Los factores previamente señalados le atribuyen a *S. aureus* la capacidad de persistir en el equipo de ordeño por medio de la formación de adherencias. Estas adherencias se han observado previamente sobre diversas superficies de materiales que componen el equipo de ordeño (Latorre et al., 2010; Pachá et al., 2020; Latorre et al., 2022; Michael et al., 2023). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene conocimiento de si existe alguna preferencia evidente por algún material en determinado. El objetivo de este trabajo es evaluar el comportamiento de cepas de *S. aureus* en distintos materiales utilizados en lecherías. De esta forma obtener más información respecto al rol del equipo de ordeño como reservorio de microorganismos de importancia en IMI y calidad de leche. También, dilucidar el riesgo de contaminación de la leche que presentan las cepas de *S. aureus* con habilidad de adherencia baja o intermedia en superficies de difícil adherencia, las que podrían ser un factor relevante a considerar en las granjas lecheras al momento

de identificar puntos críticos de riesgo de presencia de *S. aureus* en el equipo de ordeño.

Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* es una bacteria cocócea no-motil, Gram-positiva, no formadora de esporas, anaerobia facultativa, coagulasa y catalasa positivo. *S. aureus* se categoriza taxonómicamente en el dominio *Bacteria*, phylum *Bacillota*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Staphylococcaceae* y género *Staphylococcus* (Schoch et al., 2020). Las colonias cocáceas de *S. aureus* tienen tamaños de 0.8 – 1 μm y forman agrupaciones irregulares en forma de racimo de uvas. Tal formación es debida a que *S. aureus* posee la capacidad de división celular en tres planos dimensionales (Koyama et al., 1977). Así, esta formación le otorgan su nombre en griego “*staphyle*” racimo de uvas y “*kokkos*” granos (Todd, 2014). Las condiciones de crecimiento para *S. aureus* dependen de la temperatura, pH y actividad de agua (a_w) que le ofrezca el medio. Asimismo, *S. aureus* puede crecer en el rango de temperaturas de 7– 48°C, con un óptimo de 37°C. En consideración del pH, el crecimiento bacteriano se desarrolla en el rango de 4.0 – 10.0, con pH óptimo neutral (Kadariya et al., 2014). Finalmente, *S. aureus* posee un alto margen de actividad microbiana en alimentos con alta humedad, desarrollándose en un rango de a_w 0.83 – >0.99 (FDA, 2012).

Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* posee diversos factores de virulencia que permiten su ingreso a través del pezón y permanencia en la glándula mamaria, originando una IMI (Hibbitt et al., 1969; Sutra y Poutrel, 1994). En este estudio, los factores de virulencia serán comprendidos como componentes estructurales o extracelulares sintetizados por *S. aureus* que asistan en la colonización de tejidos y su accionar patógeno (Sharma et al., 2016). El conjunto de factores de virulencia que promueven la colonización de tejidos y células del hospedero durante su patogénesis son presentados en la Tabla 1. Estos factores indican que *S. aureus* está capacitado para invadir y sobrevivir en células hospederas incluyendo fibroblastos, células epiteliales y fagocíticas, evadiendo el accionar de la respuesta inmune del hospedero (Dziewanowska et al., 1999; Fowler et al., 2000; Pietrocola et al., 2017; Pidwill et al., 2021). Una vez que las células hospederas son invadidas, *S. aureus* se establece en el tejido glandular de la ubre y queda resguardada a través de granulomas de tejido fibroso (abscesos). Tal capacidad de generar abscesos le confiere a *S. aureus* resguardo de la acción de sustancias antibióticas. De este modo, a pesar de que los antibióticos circulen por el torrente sanguíneo, estos serán incapacitados de generar un efecto terapéutico en el tejido afectado (Aquib et al., 2021). Adicionalmente, se han reconocido diferentes cepas de *S. aureus* en muestras de leche que portan diferentes genes de resistencia múltiple a antibióticos (RMA) para más de 2 clases de antibióticos (Ndahetuye et al., 2021). Lo anteriormente descrito compromete la terapéutica de

los casos de IMI, produciéndose así cuadros crónicos, aumento en la tasa de eliminación y disminución en la tasa de recuperación en vacas lecheras.

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

| Factor de virulencia | Mecanismo de acción | Referencia |
|---------------------------------------|---|---------------------------|
| Péptidoglicano | Gatilla respuesta inmune innata hospedero. | Fournier y Philpott, 2005 |
| Ácidos teicoicos | Resistencia antibióticos y formación de biopelículas. | Mistretta et al., 2019 |
| Proteína A | Disminuye opsonización y fagocitosis bacteriana. | Gómez et al., 2004 |
| Proteínas de adhesión | Unión a colágeno y superficies. | Sutra y Poultrrel, 1994 |
| Capsula mucoide | Inhibición opsonización bacteriana | Wilkinson et al., 1979. |
| Coagulasa | Activación de estafilotrombina, | Friedrich et al., 2003 |
| Hialuronidasa | Invasión y diseminación en tejidos | Ibberson, 2015 |
| Catalasa | Acción antioxidante contra ROS | Foster, 2005 |
| Lipasa | Invasión celular y supervivencia bacteriana | Hu et al., 2012 |
| Hemolisinas (α y β) | Actividad citolítica y daño membranas | Vandenesch et al., 2012 |
| Leucocidina | Formación poros en membrana de leucocitos. | Alonzo y Torres, 2014. |
| Enterotoxina | Intoxicación alimentaria | Argudín et al., 2010 |
| Proteína asociada a Biopelícula (Bap) | Formación biopelícula | Latasa et al., 2006 |
| Superantígenos | Limita migración de neutrófilos y quimiotaxis | Thammavongsa et al., 2015 |

Efecto de *Staphylococcus aureus* en la calidad de leche. La leche y derivados lácteos ofrecen una amplia variedad de productos para diversas necesidades fisiológicas: leches maternizadas, productos sin lactosa, leches suplementadas con proteína, entre otros. Tales productos cuentan con ventajas tecnológicas que admiten su almacenamiento por períodos prolongados, desde su elaboración hasta su consumo (Rysstad y Kolstad, 2006). Productos como quesos maduros, quesos frescos, yogurt, leches líquidas, mantequillas y cremas se respaldan con la pasteurización para asegurar su inocuidad. Sin embargo, la pasteurización no siempre puede asegurar la calidad microbiológica del producto final destinado a los consumidores. Para el caso de *S. aureus*, la pasteurización elimina su forma vegetativa pero no así sus toxinas estafilocócicas (SE; Rall et al., 2008). Las SE son enterotoxinas termorresistentes, codificadas desde DNA cromosomal como en islas de patogenicidad (Malachowa y DeLeo, 2010). Las SE son una de las principales causas de intoxicación alimentaria, que se producen tras la ingesta de alimentos contaminados con *S. aureus*. Su consumo genera sintomatología clínica principalmente gastrointestinal de curso autolimitante. Entre las SE causantes de intoxicaciones alimentarias están la SEA, SEB, SEC, SED y SEE, las que permanecen viables en la leche posterior a la pasteurización (Pepe et al., 2006; Schelin et al., 2014; Etter et al., 2020).

La leche producida en cuartos afectados por una IMI causada por *S. aureus* sufre cambios en su composición nutricional. Cuartos mamarios que cursen con una

IMI producirán leches con menor concentración de caseína. En consecuencia, se obtendrá un menor rendimiento lechero, cuajos con mayor tiempo de coagulación y firmeza reducida junto a cambios en la textura de productos lácteos (Kelly et al., 2006; Leitner et al., 2006). Además, *S. aureus* posee enzimas extracelulares de distinto tipo. Las proteasas tienen efecto proteolítico sobre las caseínas de la leche, induciendo a su degradación (Livney et al., 2004). Para la grasa láctea, las lipasas secretadas por *S. aureus* tienen acción hidrolítica sobre el enlace éster de los triglicéridos. Por ello, los niveles de ácidos grasos se ven comprometidos, aumentando los niveles ácidos grasos libres (Rosenstein y Götz, 2000).

Por otra parte, en las IMI asociadas a *S. aureus* se observa un aumento en el recuento celular somático (RCS) del cuarto afectado (Botaro et al., 2014). El RCS posee un rol diagnóstico como indicador de la calidad de la leche (Sharma et al., 2011; Hunt et al., 2013). Se estima que leches con elevado RCS (>200.000 células/mL) se relacionan directamente a elevada actividad enzimática del tejido afectado debido a la respuesta inmune del hospedero. Por ende, es posible correlacionar un daño en la ubre bovina con un aumento del RCS en el tanque, en función a la disminución en el rendimiento lechero de cada vaca. Lo anterior repercute en el valor pagado por litro de leche y bonificaciones según la pauta de pago de la planta procesadora de leche afectando las futuras ganancias monetarias para el productor (Hadrich et al., 2018).

Efecto de *Staphylococcus aureus* en la salud pública. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son enfermedades resultantes de la ingesta de alimentos contaminados con patógenos infecciosos, sus toxinas o sustancias químicas (Hoffmann y Scallan, 2017). Las ETA pueden originarse por la constante manipulación a la que se encuentran sometidos los alimentos durante su producción. En consecuencia, un alimento puede convertirse en una potencial amenaza microbiológica para la salud de la población humana durante todo el proceso productivo. En este escenario, las ETA de origen infeccioso son parte de los problemas de salud pública más frecuentes alrededor del mundo, en las que se estima que las intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus* son de mayor importancia a nivel global (Balaban y Rasooly, 2000). Estas intoxicaciones alimentarias radican en el consumo de alimentos contaminados con SE de *S. aureus*, provocando principalmente cuadros gastrointestinales (Heidinger et al., 2009).

La leche como alimento entrega energía, proteínas de alta calidad biológica, minerales, vitaminas y todos los aminoácidos esenciales necesarios en la dieta. Lo anterior convierte a la leche en un elemento fundamental para una alimentación balanceada durante las distintas etapas del desarrollo humano. Todos los elementos que constituyen la leche son precisos para la correcta nutrición y promoción de la salud en la población humana, asociando el consumo de leche con un fomento de la salud en general (Kandpal et al., 2012; Consorcio

Lechero, 2020). Los datos anteriormente mencionados presentan la necesidad de asegurar la inocuidad de la leche cruda para ofrecer un alimento seguro microbiológicamente. Para el caso particular de la leche y subproductos lácteos, estos alimentos han sido previamente reportados en brotes de intoxicación alimentaria debido a *S. aureus* (De Buyser et al., 2001). La leche puede contaminarse y servir como medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos patógenos (Garedew et al., 2012). La leche puede contaminarse con *S. aureus* en diferentes etapas durante su producción. La contaminación puede originarse desde una ubre afectada por una IMI asociada a *S. aureus* hasta el manejo de la colecta de leche cruda (Scheer et al., 2004). En este escenario, las cepas de *S. aureus* productoras de SE toman relevancia por su alto poder de generar una ETA al hombre. La evidencia presentada por Fujikawa y Morozumi (2006) indica que la producción de SE de *S. aureus* aumenta cuando la densidad de la población bacteriana en la leche alcanza las $10^{6.5}$ UFC/mL.

Mecanismos de permanencia de *Staphylococcus aureus* en operaciones

lecheras. *Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena de carácter infeccioso, perpetuando su transmisión por el contagio de vaca a vaca. Sin embargo, *S. aureus* ha sido aislado desde otras fuentes de infección que sirven para su permanencia en lecherías (Capurro et al., 2010). Las fuentes de infección corresponden a un objeto hospedero, animado o inanimado, que sirve de medio

para la transmisión hacia un hospedero susceptible. Por otra parte, un reservorio es aquel objeto hospedero en que el agente infeccioso vive y se multiplica, sirviendo como una fuente infecciosa común para otros animales (Thrusfield et al., 2018).

La transmisión de *S. aureus* se estima sucede a través de fuentes de diverso origen como pueden ser las manos del ordeñador, las toallas de limpieza para la ubre bovina y las unidades de ordeño (Haveri et al., 2008). Lo anterior evidencia un amplio rango de fuentes de infección de *S. aureus* dentro de la lechería. Sin embargo, la ubre bovina es el principal reservorio de *S. aureus* (Blowey y Edmonson, 2010). La ubre afectada por una IMI asociada a *S. aureus* facilitará la transmisión de *S. aureus* por medio de la leche colectada. De ese modo, la descarga de leche contaminada con *S. aureus* pone en riesgo la salud del rebaño debido al potencial riesgo de transmisión vaca a vaca de *S. aureus* durante la ordeña (Barkema et al., 2009). A lo largo de la ordeña, las ubres toman contacto directo con distintas pezoneras en las unidades de ordeño. Las pezoneras comparten su uso con los distintos pezones de las vacas que serán ordeñadas. Durante este proceso, las pezoneras reciben un flujo constante de leche, permaneciendo finas películas de leche sobre la superficie de la cara interna de la pezonera. Los sedimentos de leche deben ser removidos por medio del lavado de la unidad de ordeña y así mantener la higiene necesaria. No obstante, faltas en protocolos de higienización e inadecuado recambio de piezas del equipo de

ordeño son factores que facilitan el potencial establecimiento de adherencias y formación de biopelículas (Hillerton et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Una biopelícula es una matriz de difícil eliminación dentro del equipo de ordeño, pues otorga protección de sustancias químicas y permanencia en el medio. El resguardo proporcionado por la biopelícula dificulta la erradicación bacteriana, incluso posterior a la eliminación de vacas infectadas del rebaño. Con anterioridad, se ha descrito la presencia de aislados de *S. aureus* formadores de biopelículas en diversas superficies de las granjas lecheras (Lee et al., 2014; Felipe et al., 2017; Bissong et al., 2020). Las biopelículas establecidas en las superficies del equipo de ordeña poseen un rol como fuente para la transmisión de *S. aureus* en el rebaño lechero (Latorre et al., 2020).

En un estudio realizado por Latorre et al (2020) los autores plantean que biopelículas en equipo de ordeño pueden actuar como fuente de contaminación de *S. aureus*, tanto para leche de tanque como en la transmisión de vaca a vaca. Lo anterior se debe a posibles desprendimientos de matriz extracelular, los que migran durante la ordeña y finalmente contaminan la leche de tanque. Adicionalmente, las biopelículas establecidas en la superficie interna de pezoneras poseen un contacto estrecho con pezones con esfínteres permeables durante la ordeña. Por consecuente, es posible evidenciar un aumento en la incidencia de IMI asociado con aumento en el RCS y pérdida de la calidad de la leche a nivel de granja (Guzmán-Luna et al., 2022). En el caso de las biopelículas

producidas por *S. aureus* se describe que 12 genes son codificantes para su desarrollo (Tabla 2). Tales biopelícula han sido descritas como capaces de establecerse en diversos lugares dentro de la granja lechera incluyendo: equipo de ordeño, tanques de leche y mangueras de transferencia (Weber et al., 2019; Latorre et al., 2022).

Tabla 2. Genes codificantes de *Staphylococcus aureus* que codifican para proteínas asociadas a la formación y establecimiento de biopelículas.

| Gen | Función |
|--|---|
| Gen de proteínas de unión a fibrinógeno (<i>fib</i>) | Reconocimiento de proteínas de superficie de unión a fibrinógeno. |
| Gen de proteína de unión a fibronectina (<i>fnb</i>) A y B | Invasión celular. Facilita la formación de biopelículas. |
| Gen de adhesión intercelular (<i>ica</i>) A, B, C y D | Adhesión entre células, iniciando formación de biopelículas. |
| Gen de factor de aglutinación (<i>clf</i>) A y B | Adhesión a fibrina en la superficie celular. |
| Gen de proteínas de unión a elastina (<i>ebps</i>) | Colonización bacteriana. |
| Gen de proteínas de unión a la lámina celular (<i>eno</i>) | Colonización bacteriana. |
| Gen de proteínas de unión a colágeno (<i>cna</i>) | Adhesión a colágeno en la superficie celular. |

Los antecedentes de la epidemiología de *S. aureus* como agente intramamario son ampliamente conocidos, sin embargo, poco se conoce sobre su dinámica en relación al impacto que produce una vez que el microorganismo se establece en el equipo de ordeño. Considerando la importancia de *S. aureus* en la producción de leche y la salud pública, es importante proponer estudios que permitan conocer y vincular el potencial riesgo de contaminación microbiológica en productos lácteos con *S. aureus* por el establecimiento de biopelículas en sectores de poca preocupación como, por ejemplo, gomas para sellar (o-rings).

HIPÓTESIS

Cepas de *S. aureus* que poseen habilidad de adherencia alta, media y baja son capaces de formar biopelículas *in vitro* en cloruro de polivinilo (PVC), goma de etileno propileno dieno monómero (EPDM), acero inoxidable (304 y 316 electropulido), vidrio borosilicato, silicona, policarbonato y goma de nitrilo (Buna-N), materiales utilizados en equipos de ordeño.

Objetivo general:

-Evaluar la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de *S. aureus* obtenidos desde biopelículas de equipos de ordeño.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de *S. aureus* en superficies de 8 materiales comúnmente utilizados en equipos de ordeño de lecherías.
2. Comparar la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de cepas de *S. aureus* con alta, media y baja capacidad de adherencia a superficies, en cada uno de los materiales a estudiar.

II. MATERIALES Y MÉTODO

Cepas de *Staphylococcus aureus* y criterios de selección. Se muestrearon un total de 30 operaciones lecheras de la región de Ñuble (desde un universo de 61 operaciones lecheras activas) en el marco del Proyecto Fondecyt de Iniciación 11130343 para la identificación de los aislados de *S. aureus* desde muestras de leche de estanque y superficie. Estas lecherías poseían unidades de ordeño fijas y estanque de enfriamiento de leche. Allí, las vacas se ordeñaban dos veces al día y tenían una producción de leche diaria media diaria de 10,5 L/día (Pachá et al., 2020). La recolección de aislados se realizó durante el periodo julio del 2014 a octubre del 2016 por lo que no hubo un muestreo asociado a recolección de muestras para obtención de aislados en el presente estudio. Debido a lo anterior, los aislados con los que se trabajó son parte de la colección de cepas del Laboratorio de Inocuidad de Leche y Productos Lácteos de la Universidad de Concepción. Los aislados se mantenían almacenados a -80°C.

Se utilizaron 3 cepas de *S. aureus* para la evaluación de adherencia en materiales de uso frecuente en lecherías, las que se seleccionaron en base a ensayos en placa de microtitulación (MPA) previamente realizados en el marco del Proyecto FONDEF ID20110148. Para lo anterior, se realizó originalmente un screening de MPA con 26 cepas provenientes de biopelículas de equipos de ordeño, según lo descrito por Latorre et al (2011), para evaluar su capacidad de formar

biopelículas. Se utilizó un criterio de selección en función del valor S/P Ratio, una proporción que se calculó dividiendo el promedio de la densidad óptica de la adherencia para cada cepa de *S. aureus* por el promedio de la densidad óptica de la cepa control, según lo describe Latorre et al (2011). Por lo anterior, para la cepa con menor habilidad de adherencia se utilizó el valor de S/P Ratio más bajo, para la cepa con habilidad de adherencia mediana se utilizó el doble del valor S/P Ratio más bajo y para la cepa con habilidad de adherencia alta se utilizó el valor S/P Ratio más alto de los resultados totales en MPA (Latorre et al., 2011). Así, las cepas L1-1171 de alta adherencia, L1-030 de mediana adherencia y L1-256 de baja adherencia correspondieron a los valores de S/P Ratio 0.23, 0.06 y 0.03 fueron seleccionadas respectivamente.

Las cepas seleccionadas fueron recolectadas desde adherencias macroscópicas formadas en: un colector de leche, la unidad final y una pezonera de goma respectivamente, en 3 granjas diferentes. Se utilizaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 como control positivo y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 como control negativo, debido a su habilidad de adherencia alta y baja respectivamente.

Habilidad de formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* en superficies. Para evaluar la habilidad de formación de biopelículas de *S. aureus*

en superficies de materiales utilizados en equipos de ordeño, se utilizó el sistema CDC Biofilm Reactor (CBR) (BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA) de acuerdo con un protocolo modificado a partir de lo descrito por Goeres et al (2005), Vidal et al (2020) y el manual de uso del reactor “CDC Biofilm reactor (CBR) Operator’s Manual” (BioSurface Technologies Corp., 2018). El sistema CBR es un reactor que permite la reproducción en condiciones de laboratorio de un medio propicio para el crecimiento de biopelículas sometidas a condiciones de flujo continuo (BioSurface Technologies Corp., 2018). El sistema CBR se compone por un recipiente de vidrio de 1 L con una boquilla de efluente para proporcionar 350 mL de capacidad operativa de fluido. En la parte superior del recipiente de vidrio, el sistema CBR posee una tapa de polietileno que admite 3 mangueras: una manguera de entrada de flujo de medio, una manguera con filtro para intercambio de gases y otra manguera con una boquilla para inoculación. Adicionalmente la tapa de polietileno presenta ocho orificios como base para el soporte de ocho varillas (*Rods*) de polipropileno independientes y desmontables, las cuales presentan 3 orificios en su extremo inferior capacidad para 3 cupones extraíbles (Figura 1).



Figura 1. Biorreactor de biopelícula CDC (CBR). Fuente: CDC Biofilm Reactor (CBR) Operator's manual

Limpieza y preparación de cupones. Los cupones son discos de 1.27 cm de diámetro y 0.3 cm de grosor adquiridos comercialmente desde el proveedor y fabricante de los equipos CBR (BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA) y que se utilizaron como superficies para el crecimiento de biopelículas. El equipo CBR tiene una capacidad total de 24 cupones para muestreo. Para el caso de este estudio, se utilizaron 3 cupones de cada material (PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N) por *Rod* para cada una de las cepas L1-1171, L1-030 y L1-256. Es decir, en cada ensayo se usaron 24 cupones, la capacidad total del equipo CBR.

Para la preparación inicial, los cupones se introdujeron individualmente en tubos Falcon 50 mL cubiertos con Extran 2% (Merck, Darmstadt, Germany) y se sonicaron (81 W, 40 kHz. Webber et al., 2015) durante 5 minutos. A continuación, se enjuagó cada cupón con agua corriente hasta eliminar toda la espuma del detergente y se repitió el proceso de sonicación por 5 minutos con agua destilada. Terminado la segunda sonicación, se eliminó el agua destilada residual del tubo Falcon y se secaron los cupones al aire.

Preparación de equipo CBR y formación de biopelícula bacteriana de *S. aureus* sobre materiales de uso frecuente en lecherías en equipo CBR.

Inicialmente se lavaron las piezas del equipo CBR con Extran 2% y se enjuagaron con agua destilada. Posterior a la limpieza ya descrita, se ensamblaron las piezas del equipo CBR y se instalaron los cupones anteriormente preparados en cada *Rod* según las instrucciones del fabricante. Además, se ensambló al equipo CBR la manguera de flujo de medio (5 mm) y la manguera de deshecho (8 mm), las cuales fueron clampeadas para cerrar la entrada y salida de medio. A continuación, se prepararon 500 cc (300 mg/L) de Caldo Tripticasa de Soya 0,01X (TSB) (Difco; BD Diagnostics, Sparks, MD), los que se adicionaron al interior del equipo CBR al remover dos *Rod* desde la tapa de polietileno. Luego de adicionar el medio TSB al interior del equipo CBR, se colocaron nuevamente los *Rods* removidos de su posición original. A continuación, el equipo CBR, con 500 cc de TSB en su interior, se autoclavó a 121°C por 20 minutos. Terminado el autoclave,

se esperó hasta que el equipo CBR alcanzara una temperatura que permitiese su manejo y se colocó dentro de la campana de bioseguridad. Luego, se situó sobre el agitador magnético, el cual se configuró a 125 rpm y 30°C.

Las cepas de *S. aureus* se retiraron del almacenamiento a -80°C y se cultivaron en agar Brain Heart Infusion (BHI) (Difco; BD Diagnostics, Sparks, MD) a 37°C durante 24h de forma independiente. Se separaron las siembras de cada cepa por el período de una semana, trabajando así con cultivos individuales puros. Cada siembra se incubó en la estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. Paralelamente se preparó un matraz con 100 mL de TSB 0,01X (300 mg/mL) y se incubó a 37°C por 24 horas. Después de la incubación, una sola colonia aislada de 1 uL se transfirió en condiciones estériles a los 100 mL de caldo TSB 0,01X y se incubó a 37°C durante 24 h. Un mL de este cultivo se transfirió en condiciones estériles al CBR y se incubó a 125 rpm y 30°C durante 24 h para lograr la adhesión celular inicial a los cupones.

Paralelamente, se preparó 21 L de caldo TSB 0,01X (100 mg/L) en un Carboy de Borosilicato de 20 L, el cual se utilizó para dar flujo continuo de nutrientes al equipo CBR. Luego, el Carboy de flujo con 21 L de caldo TSB 0,01X se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Cumplidas las 24 horas de fase Batch, se posicionó el Carboy de flujo dentro de la campana de bioseguridad y se conectaron las mangueras de flujo. Para lo anterior, se conectó una manguera de flujo de 6 mm

desde el Carboy de flujo a la bomba de flujo peristáltico y una manguera de 5 mm desde la bomba peristáltica al equipo CBR. De igual forma, se conectó la manguera de deshecho de 8 mm desde el equipo CBR al Carboy de desecho. Posteriormente, se removieron los clamps de las 3 mangueras y se configuró la bomba de flujo peristáltico a un flujo continuo (12,1-12,7 mL/min) de 0,003X TSB a 125 rpm y 30°C durante 96 horas, para promover la formación de biopelículas y minimizar el crecimiento planctónico. El flujo continuo se monitorizó de manera diaria para evaluar su consistencia. Flujos mayores a 12.7 mL/min producía que el medio TSB se agotase con mayor rapidez. Mientras flujos menores a 12.1 mL/min producía que el medio TSB se saturase con bacterias, limitando los nutrientes disponibles en el medio para el crecimiento bacteriano y de la biopelícula.

Al finalizar la fase de flujo de 96 horas, se detuvo el agitador magnético, se clampearon y desconectaron las mangueras desde el equipo CBR. Seguido a lo anterior, se retiraron los *Rods* con cupones de forma individual y se lavaron por ambas caras. El lavado de *Rods* se realizó por goteo con 20 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) para remover el caldo bacteriano remanente posterior a la remoción del *Rod* desde el equipo CBR. A continuación, se transfirieron asépticamente dos cupones y se depositaron en un tubo cónico estéril que contenía 10 mL de 1X PBS, los que se utilizaron para realizar recuento bacteriano. Por último, se usó vórtex y ultrasonido (81 W, 40 kHz. Webber et al., 2015) durante al menos 5 min,

hasta que la biopelícula se desprendió completamente de los cupones y permitir la homogenización de los 10 mL de 1X PBS con las células pertenecientes a la biopelícula. Los 10 mL de 1X PBS homogeneizado se utilizaron para realizar recuento bacteriano en diluciones seriadas sembradas en agar R2A (Merck, Darmstadt, Alemania), por triplicado para cada cupón los cuales se incubaron a 30°C por 24 horas.

El tercer cupón restante se preparó para ser enviado a Microscopía electrónica de barrido (SEM). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, sin incluir la repetición del ensayo 2. Tal repetición se realizó por presentar valor muy desplazados de la media y mediana en comparación a los ensayos 1 y 3.

Finalmente, el recuento bacteriano en placas R2A se realizó por triplicado, con el objetivo de dar consistencia a los resultados obtenidos. Los resultados de recuento bacteriano se expresaron en UFC/mL, con un rango de lectura en placas entre 25 a 250 colonias bacterianas.

Análisis estadístico. Los análisis estadísticos de recuentos bacterianos se llevaron a cabo en el software SAS 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC), considerando significancia estadística un valor de $p < 0,05$. Se calcularon estadísticas descriptivas por cepa y material utilizando PROC MEANS. Las diferencias en UFC/mL entre cepas y entre materiales se evaluaron mediante ANOVA (PRO MIXED).

Evaluación microscópica de las superficies de cupones. La visualización de biopelículas de cepas de *S. aureus* en la superficie de los cupones sometidos a fase de flujo en el equipo CBR se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para el caso de este estudio, un cupón de cada material con biopelícula formada en su superficie conformó la muestra a evaluar por SEM. Es decir, se estudiaron ocho muestras en cada ensayo. Por lo anterior, la preparación de las muestras se realizó según describe Latorre et al (2020), con modificaciones. Luego de retirar el *Rod* desde el equipo CBR y lavar ambas caras por goteo con 20 mL de 1X PBS, se depositó uno de los tres cupones directamente en una solución de glutaraldehído al 2,5% preparada en 1X PBS (pH 7.0-7.5). A continuación, la muestra se refrigeró inmediatamente a 4°C para ser enviadas al Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica (CESMI) de la Universidad de Concepción para su evaluación microscópica.

Financiamiento. La presente investigación se financió por el proyecto FONDEF ID20I10148. Todos los materiales de laboratorio e insumos necesarios fueron previstos por el Laboratorio de Calidad de Leche e Inocuidad de Productos Lácteos del Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Universidad de Concepción y el proyecto FONDEF ID20I10148.

III. RESULTADOS

Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de *Staphylococcus aureus* en la superficie de 8 materiales comúnmente utilizados en equipos de ordeño. Se realizaron 3 ensayos con repeticiones por triplicado para las cepas *S. aureus* de alta (L1-1171), mediana (L1-030) y baja (L1-256) capacidad de adherencia. Los resultados obtenidos con el total de ensayos, (es decir, triplicado más repeticiones) exhibieron diferencias significativas en adherencia de las cepas en metal, plástico y goma, en comparación con el resto de los materiales. También, la cepa L1-1171 presentó una mayor capacidad de formación de biopelículas en PVC ($p=0.04$), goma EPDM ($p=0.03$) y acero inoxidable 316 ($p=0.03$), en comparación con el resto de los materiales. La cepa L1-030 presentó un comportamiento similar en su capacidad de formación de biopelículas en PVC ($p=0.04$) y acero inoxidable 316 ($p=0.005$). Mientras la cepa L1-256 solamente presentó su mayor capacidad para formar biopelículas en la goma Buna-N ($p=0.004$; Tabla 3).

Tabla 3. Estadística descriptiva de la habilidad de adherencia (UFC/mL) de 3 cepas de *Staphylococcus aureus* clasificadas con alta, mediana y baja adherencia en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N considerando todos los resultados experimentales.

| Material | <i>S. aureus</i> L1-1171 (alta adherencia) | | | |
|---------------|--|------------|---------|----------------|
| | PROM | DE | MED | Min/Max |
| PVC | 189.395,8 | 290.959,6 | 2.187,5 | 910/570.000 |
| EPDM | 196.916,7 | 299.860,04 | 17.750 | 15.000/730.000 |
| Acero 316 | 203.240 | 308.677 | 9.075 | 540/645.000 |
| Vidrio | 77.695 | 118.250,7 | 6.052,5 | 205/270.000 |
| Silicona | 42.675 | 78.242,3 | 9.875 | 4.700/202.000 |
| Acero 304 | 132.358,3 | 207.713,2 | 8.650 | 1.950/495.000 |
| Policarbonato | 135.971,7 | 209.121,2 | 5.175 | 120/455.000 |
| Buna-N | 104.408,3 | 98.110,4 | 66.250 | 21.100/235.000 |
| Material | <i>S. aureus</i> L1-030 (mediana adherencia) | | | |
| | PROM | DE | MED | Min/Max |
| PVC | 23.160 | 31.179,2 | 7.500 | 195/76.000 |
| EPDM | 1.327,5 | 1.958,7 | 140 | 65/4.550 |
| Acero 316 | 31.871,7 | 55.807,6 | 8.375 | 115/14.3500 |
| Vidrio | 12.909,7 | 17.154,7 | 2.775 | 80/36.000 |
| Silicona | 19.110,8 | 19.653,1 | 14.550 | 265/47.000 |
| Acero 304 | 20.591,7 | 20.054,8 | 17.000 | 240/47.000 |
| Policarbonato | 13.548,3 | 14.631,9 | 11.325 | 890/41.500 |
| Buna-N | 18.858,3 | 10.889,8 | 17.925 | 6.550/32.000 |
| Material | <i>S. aureus</i> L1-256 (baja adherencia) | | | |
| | PROM | DE | MED | Min/Max |
| PVC | 958,3 | 1.319,7 | 215 | 0/2.710 |
| EPDM | 235 | 529,4 | 22,5 | 0/1.315 |
| Acero 316 | 3.204,2 | 4.821,8 | 315 | 0/11.050 |
| Vidrio | 2.381 | 3.443,6 | 305 | 0/7.850 |
| Silicona | 3.547,5 | 5.482,8 | 17,5 | 0/10.750 |
| Acero 304 | 2.682,5 | 4.059,9 | 452,5 | 10/9.850 |
| Policarbonato | 2.254,2 | 3.189,6 | 372,5 | 10/6.750 |
| Buna-N | 11.356,7 | 23.674,5 | 1.502,5 | 15/59.500 |

PROM: promedio aritmético de recuentos en UFC; DE: desviación estándar; MED: mediana; MIN/MAX: valor mínimo y máximo.

Los resultados presentados anteriormente consideraron la totalidad de ensayos realizados. Sin embargo, la segunda repetición de ensayos en triplicado para las

cepas L1-1171, L1-030 y L1-256 presentaron una alta variabilidad con valores que no fueron concordantes con los ensayos previos y repeticiones (valores outliers). Por lo anterior, se presentan a continuación también los resultados obtenidos descartando el ensayo outlier, de tal forma de evitar sesgos debidos a valores fuera del rango esperado.

La capacidad de formación de biopelículas de una misma cepa (L1-1171, L1-030 o L1-256) no fue significativamente diferente entre materiales, con la excepción de la goma Buna-N, en el que las tres cepas tenían una mayor capacidad de formación de biopelículas en comparación con otros materiales. *Staphylococcus aureus* L1-030 (capacidad de adherencia media) presentó una formación de biopelículas significativamente mayor en silicona en comparación con el vidrio de borosilicato y el acero inoxidable 316.

El análisis estadístico de los datos obtenidos excluyendo el ensayo 2, que poseía valores outliers, exhibieron igualmente diferencias significativas para las 3 cepas solamente en materiales de tipo goma ($p < 0.05$). La cepa L1-1171 presentó una mayor capacidad de formación de biopelículas en goma Buna-N ($p < 0.0001$) y goma EPDM ($p = 0.0190$). La cepa L1-030 presentó una mayor capacidad de formación de biopelículas en para silicona ($p = 0.0007$) y goma Buna-N ($p = 0.0017$). Mientras la cepa L1-256 presentó su mayor capacidad para formar

biopelículas solamente en la goma Buna-N ($p= 0.0049$), con el valor más alto de significancia para goma Buna-N al comparar entre las 3 cepas (Tabla 4).

Tabla 4. Estadística descriptiva de la habilidad de adherencia (UFC/mL) de 3 cepas de *Staphylococcus aureus* clasificadas con alta, mediana y baja adherencia en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N después de la remoción de valores experimentales outliers.

| Material | <i>S. aureus</i> L1-1171 (alta adherencia) | | | |
|---------------|--|----------|---------|---------------|
| | PROM | DE | MED | Min/Max |
| PVC | 1.593,7 | 828,5 | 1.357,5 | 910/2.750 |
| EPDM | 16.625 | 1.493,04 | 16.500 | 15.000/18.500 |
| Acero 316 | 4.860 | 4.868,2 | 4.875 | 540/9.150 |
| Vidrio | 3.542,5 | 4.508,3 | 1.882,5 | 205/10.200 |
| Silicona | 8.262,5 | 2.460,1 | 9.100 | 4.700/10.150 |
| Acero 304 | 6.037,5 | 3.672,9 | 5.725 | 1.950/10.750 |
| Policarbonato | 2.707,5 | 3.358,8 | 1.680 | 120/7.350 |
| Buna-N | 43.862,5 | 3.6323,6 | 28.425 | 21.100/97.500 |
| | <i>S. aureus</i> L1-030 (mediana adherencia) | | | |
| | PROM | DE | MED | Min/Max |
| PVC | 4.115 | 4.934,6 | 2.557,5 | 195/11.150 |
| EPDM | 103,8 | 58,5 | 80 | 65/190 |
| Acero 316 | 4.307,5 | 4.849,8 | 3.632,5 | 115/9.850 |
| Vidrio | 1.863,8 | 1.341,1 | 2.037,5 | 80/3.300 |
| Silicona | 21.391,5 | 24.396,8 | 19.150 | 265/47.000 |
| Acero 304 | 8.637,5 | 9.723,7 | 7.955 | 240/18.400 |
| Policarbonato | 6.547,5 | 5.571,6 | 6.800 | 890/11.700 |
| Buna-N | 19.325 | 13.720,6 | 19.375 | 6.550/32.000 |
| | <i>S. aureus</i> L1-256 (baja adherencia) | | | |
| | PROM | DE | MED | Min/Max |
| PVC | 1.435 | 1.412,1 | 1.460 | 110/2.710 |
| EPDM | 352,5 | 641,8 | 37,5 | 20/1.315 |
| Acero 316 | 4.782,5 | 5.364,9 | 3.947,5 | 185/11.050 |
| Vidrio | 3.968,3 | 3.777,2 | 3.750 | 305/7.850 |
| Silicona | 5.315 | 6.132,3 | 5.255 | 0/10.750 |
| Acero 304 | 4.013,8 | 4.514,7 | 2.967,5 | 270/9.850 |
| Policarbonato | 3.343,8 | 3.493,5 | 3.277,5 | 70/6.750 |
| Buna-N | 17.026,3 | 28.382,3 | 3.672,5 | 1.260/59.500 |

PROM: promedio aritmético de recuentos en UFC; DE: desviación estándar; MED: mediana; MIN/MAX: valor mínimo y máximo.

Comparación de la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* con alta, media y baja capacidad de adherencia a superficies, en materiales de equipos de ordeña. Al comparar la capacidad de formación de biopelículas sobre la superficie de los 8 materiales estudiados, los resultados obtenidos con el total de ensayos exhibieron diferencias significativas solamente para materiales de tipo goma y acero ($p < 0.05$). De este modo, La cepa L1-1171 tuvo una formación de biopelículas significativamente mayor en la goma Buna-N en comparación con la goma EPDM. Mientras, la cepa L1-030 tuvo una formación de biopelícula significativamente mayor en comparación con las cepas L1-1171 y L1-256 en acero inoxidable 316 ($p = 0.0049$) (Tabla 5).

Tabla 5. Diferencias significativas en formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* de alta, mediana y baja adherencia en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N.

| <i>S. aureus</i> L1-030 (mediana adherencia) | | | | |
|--|------------------|----------|-------------------|----------|
| Material | LSM(DE) | Material | LSM(DE) | Valor p* |
| A-316 | 31.872 (10.710) | Buna-N | 18.858 (10.710) | 0,05 |
| <i>S. aureus</i> L1-256 (baja adherencia) | | | | |
| | LSM(DE) | Material | LSM(DE) | Valor p* |
| Buna-N | 11.357 (3.732,4) | EPDM | 235 (3.732,4) | 0,04 |
| Buna-N | 11.357 (3.732,4) | PVC | 958,3 (3.732,4) | 0,06 |
| Buna-N | 11.357 (3.732,4) | Poli | 2.254,2 (3.732,4) | 0,09 |

A-316: acero inoxidable 316; POLI: policarbonato.

LSM: Media de mínimos cuadrados; DE: desviación estándar.

*Diferencias estadísticamente significativas entre materiales para una misma cepa.

Al comparar la capacidad de formación de biopelículas sobre la superficie de los materiales estudiados, en un mismo material, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cepas, a excepción de la goma EPDM en el

que la cepa de *S. aureus* altamente adherente (L1-1171) tuvo una formación de biopelícula significativamente mayor en comparación con las cepas de adherencia media (L1-030) y baja (L1-256) ($p < 0.0001$). Mientras, la cepa L1-030 tuvo una formación de biopelículas significativamente mayor en la silicona en comparación con el vidrio y el acero inoxidable 316 (Tabla 6).

Tabla 6. Diferencias significativas en formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* de alta, mediana y baja adherencia (excluyendo ensayo con datos outlier) en PVC, goma EPDM, acero 316 con electro pulido, vidrio borosilicato, silicona, acero 304, policarbonato y goma Buna-N.

| <i>S. aureus</i> L1-1171 (alta adherencia) | | | | |
|--|------------------|----------|-------------------|----------|
| Material | LSM(DE) | Material | LSM(DE) | Valor p* |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | A-304 | 6.037,5 (6.607,7) | 0,0005 |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | A-316 | 4.860 (6.607,7) | 0,0003 |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | EPDM | 16.625 (6.607,7) | 0,008 |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | PVC | 1.593,8 (6.607,7) | 0,0001 |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | POLI | 2.707,5 (6.607,7) | 0,0002 |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | Silicona | 8.262,5 (6.607,7) | 0,0009 |
| Buna-N | 43.863 (6.607,7) | Vidrio | 3.542,5 (6.607,7) | 0,0002 |
| <i>S. aureus</i> L1-030 (mediana adherencia) | | | | |
| | LSM(DE) | Material | LSM(DE) | Valor p* |
| BUNA-N | 19.325 (5.473,6) | EPDM | 103,8 (5.473,6) | 0,02 |
| BUNA-N | 19.325 (5.473,6) | Vidrio | 1.863,8 (5.473,6) | 0,03 |
| BUNA-N | 19.325 (5.473,6) | PVC | 4115 (5.473,6) | 0,06 |
| Silicona | 21.391 (5.473,6) | Vidrio | 1.863,8 (5.473,6) | 0,02 |
| Silicona | 21.391 (5.473,6) | A-316 | 4307,5 (5.473,6) | 0,04 |
| Silicona | 21.391 (5.473,6) | Poli | 6.547,5 (5.473,6) | 0,07 |
| <i>S. aureus</i> L1-256 (baja adherencia) | | | | |
| | LSM(DE) | Material | LSM(DE) | Valor p* |
| BUNA-N | 17.026 (5.466,7) | EPDM | 352,5 (5.466,7) | 0,04 |
| BUNA-N | 17.026 (5.466,7) | PVC | 1.435 (5.466,7) | 0,06 |
| BUNA-N | 17.026 (5.466,7) | POLI | 3.343,7 (5.466,7) | 0,09 |

A-304: acero inoxidable 304; A-316: acero inoxidable 316; POLI: policarbonato.

LSM: Media de mínimos cuadrados; DE: desviación estándar.

*Diferencias estadísticamente significativas entre materiales para una misma cepa.

Para el total de datos (excluyendo outliers), no hubo diferencias significativas en la capacidad de formación de biopelículas entre las 3 cepas de *S. aureus* en los 8 materiales estudiados. No obstante, la cepa L1-1171 posee una mayor capacidad de formación de adherencias microscópicas por sobre las cepas L1-030 y L1-256 en la goma Buna-N (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de habilidad de adherencia entre cepas de *Staphylococcus aureus* para distintos materiales con el total de datos.

| Material | LSM(DE) de <i>Staphylococcus aureus</i> * | | | | | |
|----------|---|-----------|---|-------|--|-----------|
| | L1-030/L1-1171 | | L1-030/L1-256 | | L1-1171/L1-256 | |
| PVC | 23.160 (68.973)/ 189.396 (68.973) | p=0,3 | 23.160 (68.973)/ 958,3 (68.973) | p=0,2 | 189.396 (68.973)/ 958,3 (68.973) | p=0,9 |
| EPDM | 1.327,5 (70.679)/ 196.917 (70.679) | p=<0,0001 | 1.327,5 (70.679)/ 235 (70.679) | p=0,7 | 196.917 (70.679)/ 235 (70.679) | p=<0,0001 |
| A-316 | 31.872 (73.942)/ 203.240 (73.942) | p=0,9 | 31.872 (73.942)/ 3.204 (73.942) | p=0,9 | 203.240 (73.942)/ 3.204 (73.942) | p=0,9 |
| Vidrio | 12.909 (29.162)/ 77.695 (29.162) | p=0,5 | 12.909 (29.162)/ 2.381 (31.945) | p=0,4 | 77.695 (29.162)/ 2.381 (31.945) | p=0,9 |
| Silicona | 19.111 (19.059)/ 42.675 (19.059) | p=0,2 | 19.111 (19.059)/ 3.547,5 (19.059) | p=0,2 | 42.675 (19.059)/ 3.547,5 (19.059) | p=0,8 |
| A-304 | 20.592 (49.195)/ 132.358 (49.195) | p=0,6 | 20.592 (49.195)/ 2.682,5 (49.195) | p=0,3 | 132.358 (49.195)/ 2.682,5 (49.195) | p=0,7 |
| Poli | 13.548 (49.417)/ 135.972 (49.417) | p=0,2 | 13.548 (49.417)/ 2.254,17 (49.417) | p=0,3 | 135.972 (49.417)/ 2.254,17 (49.417) | p=0,8 |
| Buna-N | 18.854 (23.927)/ 104.408 (23.927) | p=0,2 | 18.854 (23.927)/ 11.357 (23.927) | p=0,9 | 104.408 (23.927)/ 11.357 (23.927) | p=0,2 |

A-304: acero inoxidable 304; A-316: acero inoxidable 316; POLI: policarbonato.

LSM: Media de mínimos cuadrados; DE: Desviación estándar.

*Valor p: Diferencias estadísticamente significativas entre cepas para un mismo material.

Igualmente, considerando el total de datos (excluyendo outliers), tampoco se observaron diferencias significativas en la capacidad de formación de adherencias microscópicas entre las 3 cepas de *S. aureus*. Así también, se observó el mismo comportamiento para la cepa L11-1171 donde ésta presenta una mayor capacidad formadora de biopelícula en comparación a L1-256 y a L1-030 (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de habilidad de adherencia entre cepas de *Staphylococcus aureus* para distintos materiales después de la exclusión de datos outliers.

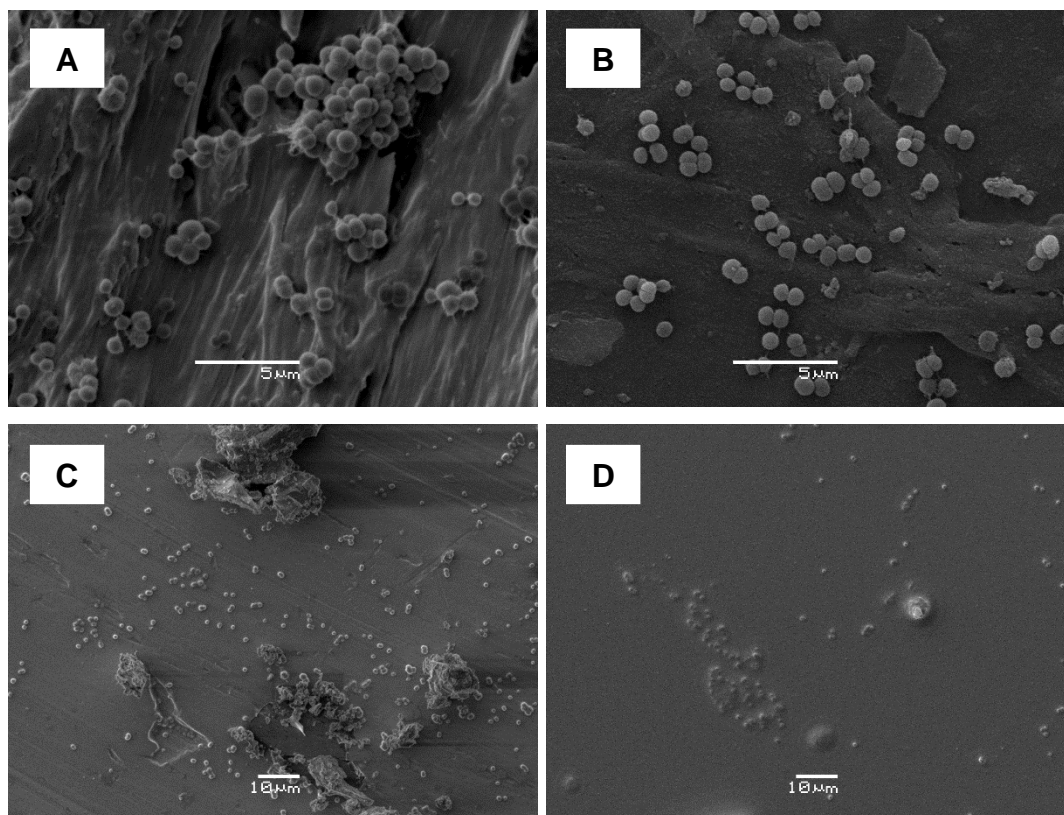
| Material | LSM(DE) de <i>Staphylococcus aureus</i> * | | | | | |
|-----------|---|-----------|---------------|-------|----------------|-----------|
| | L1-030/L1-1171 | | L1-030/L1-256 | | L1-1171/L1-256 | |
| PVC | 4.115 | | 4.115 | | 1.593,75 | |
| | (1.500,8)/ | p=0,3 | (1.500,8)/ | p=0,2 | (1.500,8)/ | p=0,9 |
| | 1.593,75 | | 1.435 | | 1.435 | |
| (1.500,8) | (1.500,8) | | (1.500,8) | | | |
| EPDM | 103,75 | p=<0,0001 | 103,75 | p=0,7 | 16.625 | p=<0,0001 |
| | (469,4)/ | | (469,4)/ | | (469,4)/ | |
| | 16.625 | | 352,5 | | 352,5 | |
| A-316 | (469,4) | p=0,9 | (469,4) | p=0,9 | (469,4) | p=0,9 |
| | 4.307,5 | | 4.307,5 | | 4.860 | |
| | (2.516,65)/ | | (2.516,65)/ | | (2.516,65)/ | |
| Vidrio | 4.860 | p=0,5 | 4.782,5 | p=0,4 | 4.782,5 | p=0,9 |
| | (2.516,65) | | (2.516,65) | | (2.516,65) | |
| | 1.863,75 | | 1.863,75 | | 3.542,5 | |
| Silicona | (1.722,1)/ | p=0,2 | (1.722,1)/ | p=0,2 | (1.722,1)/ | P=0,8 |
| | 3.542,5 | | 3.968,3 | | 3.968,3 | |
| | (1.722,1) | | (1.722,1) | | (1.722,1) | |
| A-304 | 21.391 | p=0,6 | 21.391 | p=0,3 | 8.262,5 | p=0,7 |
| | (7.296,5)/ | | (7.296,5)/ | | (7.296,5)/ | |
| | 8.262,5 | | 5.315 | | 5.315 | |
| Poli | (7.296,5) | p=0,2 | (7.296,5) | p=0,3 | (7.296,5) | p=0,8 |
| | 8.637,5 | | 8.637,5 | | 6.037 | |
| | (3.271,37)/ | | (3.271,37)/ | | (3.271,37)/ | |
| Buna-N | 6.037 | p=0,2 | 4.013,75 | p=0,9 | 4.013,75 | p=0,2 |
| | (3.271,37) | | (3.271,37) | | (3.271,37) | |
| | 6.547,5 | | 6.547,5 | | 2.707,5 | |
| Buna-N | (2.131,7)/ | p=0,2 | (2.131,7)/ | p=0,3 | (2.131,7)/ | p=0,8 |
| | 2.707,5 | | 3.343,75 | | 3.343,75 | |
| | (2.131,7) | | (2.131,7) | | (2.131,7) | |
| Buna-N | 19.325 | p=0,2 | 19.325 | p=0,9 | 43.863 | p=0,2 |
| | (13.884)/ | | (13.884)/ | | (13.884)/ | |
| | 43.863 | | 17.026 | | 17.026 | |
| | (13.884) | | (13.884) | | (13.884) | |

A-304: acero inoxidable 304; A-316: acero inoxidable 316; POLI: policarbonato.

LSM: Media de mínimos cuadrados; DE: Desviación estándar.

*Valor p: Diferencias estadísticamente significativas entre cepas para un mismo material.

Evaluación de biopelículas en SEM. La microscopía electrónica de barrido permite observar la interacción entre las bacterias y la superficie. Se visualizaron biopelículas formadas por *S. aureus* en la superficie de los 8 materiales analizados por SEM tras un periodo de incubación de 7 días a 37 °C de incubación (Figura 2). Los hallazgos obtenidos demuestran que las cepas L1-1171, L1-030 y L1-256 de *S. aureus* fueron capaces de formar biopelículas en la superficie de todos los materiales estudiados. También, se observó que las biopelículas estaban compuestas por estructuras fibrosas similares a la matriz extracelular y células cocáceas correspondientes a *S. aureus* agrupadas. También, en algunas zonas de la superficie de la biopelícula, las células estaban separadas de la biopelícula (Figura 2).



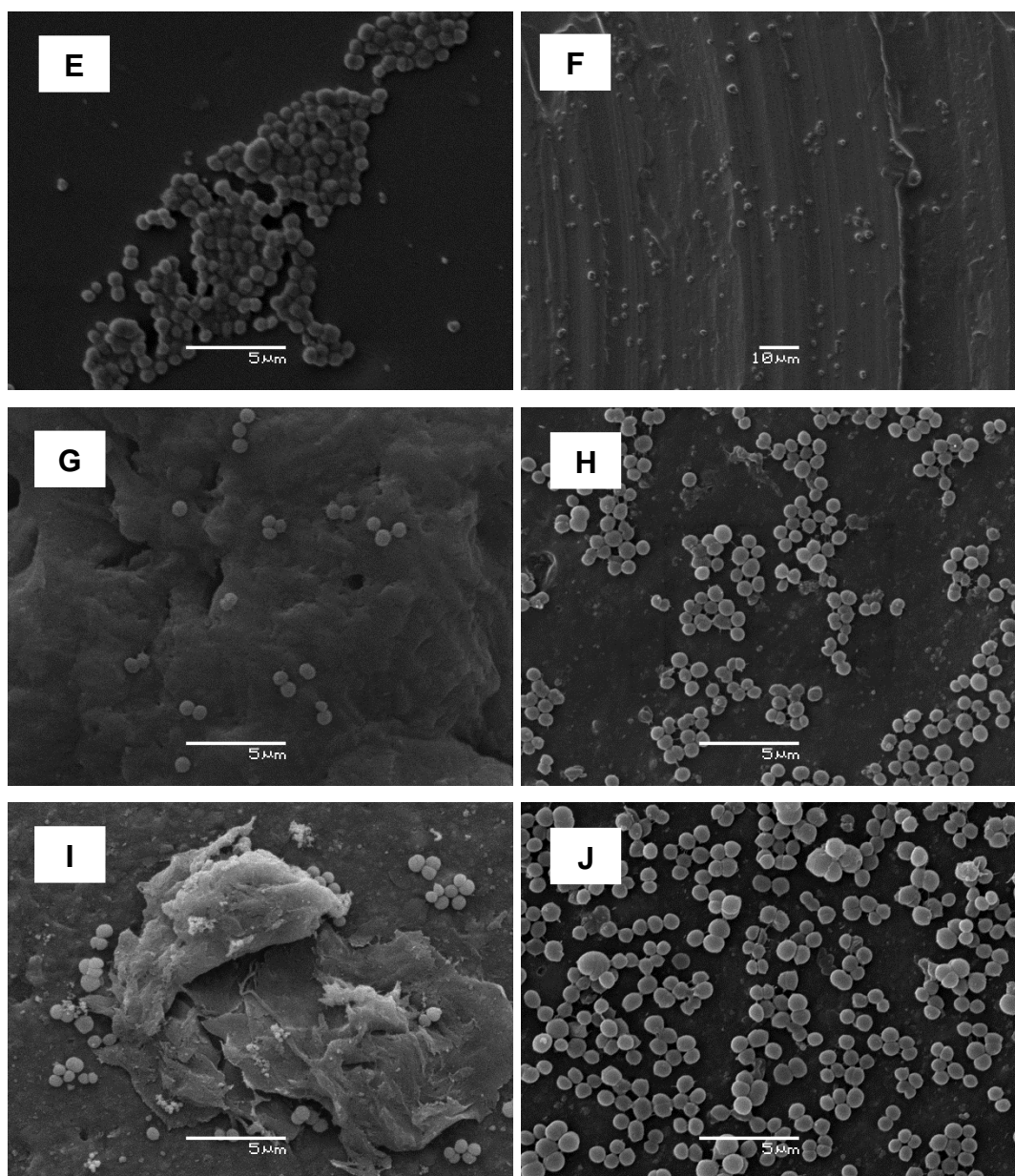


Figura 2. Imagen de *Staphylococcus aureus* adheridas a superficies, de forma aislada y en biopelículas formadas *in-vitro* en la superficie de cupones de PVC (A), goma EPDM (B), acero 316 (C), vidrio borosilicato (D), silicona (E), acero 304 (F), policarbonato (G) y goma Buna-N (H, I, J).

DISCUSIÓN

Staphylococcus aureus es un patógeno intramamario infeccioso que puede permanecer en lecherías a través del establecimiento de biopelículas en distintas superficies (Ávila-Novoa et al., 2022). Tales biopelículas son un riesgo para la salud de la ubre y la calidad microbiológica de la leche (Weber et al., 2019). Este estudio destaca la preferencia de *S. aureus* por gomas y el rol de las adherencias en el equipo de ordeño como potencial causante de contaminación de la leche de estanque. Los resultados obtenidos muestran una mayor formación de biopelículas en goma Buna-N (componente de pezoneras, mangueras de leche y gasquets) para las 3 cepas de *S. aureus* en comparación con otros materiales, independiente de su capacidad de adherencia en ensayos de MPA. Lo anterior sugiere que *S. aureus* podría tener preferencia por determinados materiales y, en consecuencia, comportarse de forma diferente respecto a la formación de biopelículas en función del material y no de su capacidad intrínseca para adherirse a superficies. Esto ha sido previamente reportado también en otras especies tales como *Listeria monocytogenes.*, *Bacillus spp.* y *P. aeruginosa* (Beresford et al., 2001; Doijad et al., 2015; Tuon et al., 2022; Catania et al., 2023).

Los resultados obtenidos del ensayo 2 muestran diferencias notorias al comparar con los ensayos 1 y 3. Por ello, toda analítica aplicada en los 3 ensayos conjuntos produjo un desplazamiento de la media y mediana, alterando los resultados y su

representatividad. Para lo anterior, y con la intención de evitar sesgos y distorsiones se realizó en paralelo un análisis con el total de los datos obtenidos, excluyendo outliers (Ott & Longnecker, 2001). Un outlier se define como un valor atípico extremo dentro de un conjunto numérico, el cual genera distorsión en la media como medida del valor central. Por lo anterior, la presente discusión se basa en los resultados obtenidos excluyendo los datos outliers, para así reducir potenciales sesgos causados por esta desviación en datos numéricos. Esta desviación, que ocurrió entre diversos ensayos podría explicarse por el hecho de que al inicio de cada experimento se trabajó con siembra de colonias en Agar BHI según protocolo, seleccionando una colonia aislada, de bordes lisos y tamaño similar a la horquilla del asa graduada de 1 uL. Hay que señalar que las colonias seleccionadas de 1 uL sembrada podrían no tener la misma densidad de células bacterianas en cada ensayo realizado, pudiendo existir una variación en los resultados obtenidos al crecer exponencialmente un número superior de bacterias en el inóculo inicial. Esto además explicaría la variación entre ensayos, si bien hubo consistencia interna en cada uno de los experimentos realizados. Lo anterior obedece a diversos factores: variaciones biológicas propias del crecimiento bacteriano, diferencias en el inóculo inicial, falta de medición de la densidad óptica o posible contaminación del ensayo con otro microorganismo. Si bien esto último puede descartarse al analizar las imágenes obtenidas mediante SEM en donde no se observa otro tipo de bacterias complementario a la evaluación macroscópica de las colonias sembradas en Agar R2A: colonias

redondas de bordes lisos y definidos de color crema, propias de *S. aureus* en este agar. En esta investigación no utilizamos la medición de la densidad óptica pues el protocolo establecido no lo solicitaba. Por lo anterior, esta parecería ser una razón viable para la variabilidad en los datos obtenidos al comparar los resultados obtenidos inter-ensayos, no así al analizarlos intra-ensayos. Otros autores han utilizado la medición de la densidad óptica en su metodología, sin embargo, no presentan resultados comparables a los nuestros, ya que aquellos estudios evalúan genes de resistencia antibiótica y detección y caracterización de *S. aureus* en superficies (Leoney et al., 2020; Singh et al., 2023).

En los ensayos obtenidos fue posible observar que las 3 cepas de *S. aureus* estudiadas presentaron predominancia hacia los materiales de goma. La goma es un material que compone numerosas piezas del equipo de ordeño, tales como pezoneras, mangueras de leche, válvulas de colectores de leche, manguera de transferencia, sellos y o-rings en distintas piezas, además de sellos de las uniones de la línea de leche. Algunas de estas piezas de goma tienen contacto directo con el pezón, por lo que podrían constituir un potencial reservorio de patógenos causantes de infecciones intramamarias, tal como *S. aureus* (Latorre et al., 2020). Asimismo, existen piezas de goma que toman contacto directo con la leche (como, por ejemplo, mangueras de leche) en donde se ha identificado por análisis molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y PCR la presencia de *S. aureus* con los mismos pulsotipos o clones, lo cual

sugiere potencial contaminación de la leche al tomar contacto con estas superficies contaminadas (Latorre et al., 2020; Pachá et al., 2021). Como se observó previamente en los resultados, las cepas de *S. aureus* poseen mayor predilección a este material, independiente de su capacidad de adherencia en MPA, por lo que se hace especialmente relevante el recambio regular de estas piezas, a fin de evitar deterioro del material que facilite la adhesión y colonización de bacterias, así como también de biopelículas que pudieran haberse formado con el uso.

En estudios realizados en 30 lecherías de la provincia de Ñuble se señala que en general existe un buen manejo y cumplimiento de recambio regular de pezoneras, según las indicaciones del fabricante que señala a vida máxima de 2500 a 3000 ordeñas (Boast et al., 2008). Sin embargo, esto en la gran mayoría de las lecherías estudiadas no se cumple para otras piezas de goma o silicona como mangueras, gaskets y válvulas de colectores. Estas piezas solamente son cambiadas en su mayoría cuando se rompen y no según las indicaciones del fabricante (A. Latorre, comunicación personal, 20 de marzo de 2024). Todo esto permite concluir que las cepas de *S. aureus*, independiente de su capacidad de adhesión en MPA, representan un riesgo latente de persistencia de *S. aureus* y de contaminación directa a la ubre y la leche recolectada.

También se ha reportado que hay diferencias respecto a formación de biopelículas en otros materiales tales como PVC, silicona, vidrio y acero inoxidable (Marquez et al., 2007; Hamadi et al., 2014; Lee et al., 2014). Es importante tener en cuenta respecto a los resultados obtenidos que las pruebas de detección para evaluar la capacidad de adherencia por ensayos de MPA se llevan a cabo en placas de PVC. Lo anterior es relevante ya que las placas de PVC podrían no reflejar necesariamente la capacidad de adherencia de las cepas de *S. aureus* en otras superficies. Algunos autores sugieren que el factor de hidrofobicidad del material afectaría a la adhesión o desprendimiento de las bacterias superficiales durante la formación de la biopelícula (Gu et al., 2017). Nuestros resultados exhiben una preferencia de *S. aureus* por materiales de goma, pero la silicona no fue un material para el cual *S. aureus* tuviese la misma predilección para formación de biopelículas. En el caso de la silicona, previamente se ha reportado la formación de biopelículas en este material, sin embargo, sólo para el caso particular de *S. epidermidis* (Sousa et al., 2009). Para el caso de *S. aureus*, diversos estudios concluyen que no hay la formación de biopelículas en silicona o las adherencias formadas no son significativas en comparación a otros materiales (Lee et al., 2014; Fink et al., 2017; Massaglia et al., 2021). Tales estudios no evalúan la presencia de los genes asociados a la formación de biopelículas de estafilos (*icaD*, *bap*, *eno*; Gajewska et al., 2020), lo que deja la interrogante respecto a qué factores de *S. aureus*, intrínsecos o extrínsecos, serían responsables de la capacidad de formación de biopelículas

en comparación a otras especies bacterianas que producen biopelículas en superficies de silicona. Para el caso del vidrio y acero inoxidable, estudios previos han reportado cepas de *S. aureus* con aumento de formación de biopelículas en estos materiales, exhibiendo una mayor formación de biopelícula en vidrio en comparación al acero inoxidable (Márquez et al., 2007; Hamadi et al., 2013). La formación de biopelículas en vidrio y acero no es aplicable en nuestros resultados, ya que no se presentaron diferencias significativas para la formación de biopelículas en estos materiales.

Es importante tener en consideración que el entorno de la lechería y otros factores del equipo de ordeño, como el desgaste de los materiales, la presencia de residuos de leche o piedras de leche, arañazos, etc., también podrían influir en la formación de estas biopelículas, al modificar las superficies y facilitar la adhesión inicial y posterior colonización de bacterias (Latorre et al., 2010). Esto es relevante ya que los factores previamente señalados no se reflejan en las condiciones de laboratorio utilizadas para la creación de biopelículas *in vitro*. Por tanto, la formación de biopelículas en otros materiales comúnmente utilizados en equipos de ordeño podría variar en condiciones naturales dependiendo del entorno y condiciones de cada lechería.

La calidad inicial de la leche producida y destinada para la industria tiene un efecto importante en el producto final (Barbano et. al, 2006). La presencia de *S.*

aureus en una planta de procesamiento podría dar lugar a una contaminación posterior al tratamiento de la leche y elaboración de subproductos. Por ello la prevención del establecimiento de biopelículas en el equipo de ordeño es un paso crucial para cumplir el requisito de una leche segura y de alta calidad. Hasta donde sabemos, este estudio es el primer informe que indica la preferencia de la goma en cepas de *S. aureus* para la formación de biopelículas *in vitro* en materiales que componen el equipo de ordeño. Por ello, es necesario mantener la higiene en la rutina de ordeño, la correcta aplicación de los protocolos de limpieza y mantenimiento del equipo de ordeño previniendo el establecimiento de biopelículas y la posterior contaminación de la leche de tanque.

IV. CONCLUSIONES

1. Las cepas L1-1131, L1-030 y L1-256 de *S. aureus* fueron capaces de formar biopelículas sobre la superficie de los 8 materiales estudiados. La capacidad de formación de biopelículas de una misma cepa (L1-1171, L1-030 o L1-256) no fue significativamente diferente entre materiales, con la excepción de la goma Buna-N, en el que las tres cepas tenían una mayor capacidad de formación de biopelículas en comparación con otros materiales.
2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de formación de biopelículas entre cepas para un mismo material, a excepción de la goma EPDM en el que la cepa de *S. aureus* altamente adherente tuvo una formación de biopelícula significativamente mayor en comparación con las restantes cepas.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alonzo, III. F., & Torres, V. J. (2014). The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78, 199–230. Doi 10.1128/MMBR.00055-13.

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 2 (7), 1751–1773. Doi:10.3390/toxins2071751.

Aquib, A., Ijaz, M., Shoaib, M., Muzzamil, I., Hussain, H., Zaheer, T., Ahmed, R., Sarwar, I., Khan, Y., & Nasser, M. (2021). *Staphylococcus aureus* and Dairy Udder en Aqib, A. (Ed.), *Insights Into Drug Resistance in Staphylococcus aureus. Infectious Diseases* (pp. 1-24). Doi:10.5772/intechopen.95864

Avila-Novoa, M. G., Solis-Velazquez, O. A., Guerrero-Medina, P. J., González-Gómez, J. P., González-Torres, B., Velázquez-Suárez, N. Y., Martínez-Chávez, L., Martínez-González, N. E., De la Cruz-Color, L., Ibarra-Velázquez, L. M., Cardona-López, M. A., Robles-García, M. Á., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2022). Genetic and compositional analysis of biofilm formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1001700. Doi: 10.3389/fmicb.2022.1001700

Balaban, N., & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61 (1), 1–10. Doi:10.1016/s0168-1605(00)00377-9

Barkema, H., Green, M., Bradley, A., & Zadoks, R. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science*, 92 (10), 4717- 4729. Doi: 10.3168/jds.2009-2347.

Beresford, M. R., Andrew, P. W., & Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1000–1005. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01330.x.

BioSurface Technologies Corp., 2018. CDC Biofilm Reactor (CBR) Operator's Manual.

Bissong, M. E. A., & Ateba, C. N. (2020). Genotypic and Phenotypic Evaluation of Biofilm Production and Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk, North West Province, South Africa. *Antibiotics*, 9(4), 156. Doi: 10.3390/antibiotics9040156

Boast, D., Hale, M., Turner, D., & Hillerton, J. E. (2008). Variation in Rubber Chemistry and Dynamic Mechanical Properties of the Milking Liner Barrel with Age. *Journal of Dairy Science*, 91(6), 2247–2256. Doi: 10.3168/jds.2007-0316

Botaro, B. G., Cortinhas, C. S., Dibbern, A. G., Silva, L. F. P., Benites, N. R., & Dos Santos, M. V. (2014). *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 47(1), 61–66. Doi: 10.1007/s11250-014-0683-5

Bronnec, V., Turoňová, H., Bouju, A., Cruveiller, S., Rodrigues, R., Demnerova, K., Tresse, O., Haddad, N., & Zagorec, M. (2016). Adhesion, Biofilm Formation, and

Genomic Features of *Campylobacter jejuni* Bf, an Atypical Strain Able to Grow under Aerobic Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1002. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01002

Blignaut, D., Thompson, P. & Petzer, I-M. (2018). Prevalence of mastitis pathogens in South African pasture-based and total mixed ration-based dairies during 2008 and 2013. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 85(1), a1482. Doi: 10.4102/ojvr.v85i1.1482

Blowey, R. W. & Edmondson, P. (2010). Chapter 3: Teat and Udder defences, en *Mastitis control in dairy herds* (2nd Edition, pp. 20-25). Editorial CABI.

Capurro, A., Aspán, A., Ericsson Unnerstad, H., Persson Waller, K., & Artursson, K. (2010). Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 180–191. Doi:10.3168/jds.2009-2471

Catania, A. M., Di Ciccio, P., Ferrocino, I., Civera, T., Cannizzo, F. T., & Dalmasso, A. (2023). Evaluation of the biofilm-forming ability and molecular characterization of dairy *Bacillus* spp. isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 31, 13:1229460. Doi: 10.3389/fcimb.2023.1229460.

Consorcio Lechero. (2020). Sección 4: Importancia de los lácteos en el ciclo vital y patologías específicas. En R. Valenzuela (Ed.), *Lácteos: Nutrición y Salud* (pp. 137-291).

- De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M., & Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67 (1-2), 1–17. Doi: 10.1016/s0168-1605(01)00443-3
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., & Chakraborty, T. (2015). Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLoS One*, 11, 10 (9) :e0137046. Doi: 10.1371/journal.pone.0137046.
- Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., Trumble, W. R., & Bohach, G. A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and Immunity Journal*, 67, (9) , 4673–4678. Doi: 10.1128/IAI.67.9.4673-4678.1999
- Etter, D., Schelin, J., Schuppler, M., & Johler, S. (2020). Staphylococcal Enterotoxin C- An Update on SEC Variants, Their Structure and Properties, and Their Role in Foodborne Intoxications. *Toxins*, 12(9), 584. Doi: 10.3390/toxins12090584
- Felipe, V., Morgante, C. A., Somale, P. S., Varroni, F., Zingaretti, M. L., Bachetti, R. A., Correa, S.G., & Porporatto, C. (2017). Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microbial Pathogenesis*, 104 , 278–286. Doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.047
- Food and Drug Administration. (2012). *Staphylococcus aureus*, en *Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook* (2nd Edition, pp. 87–91). Silver Spring. Consulta: 22 octubre 2022.

- Fink, R., Okanovič, D., Dražič, G., Abram, A., Oder, M., Jevšnik, M., & Bohinc, K. (2017). Bacterial adhesion capacity on food service contact surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 27 (3), 169–178. Doi: 10.1080/09603123.2017.1310188
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (12), 948–958. Doi: 10.1038/nrmicro1289
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12 (1), 49–62. Doi: 10.1038/nrmicro3161
- Fournier, B., & Philpott, D. J. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (3), 521–540. Doi: 10.1128/cmr.18.3.521-540.2005
- Fowler, T., Wann, E., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. & Höök, M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *European Journal of Cell Biology*, 79 (10), 672–679. Doi: 10.1078/0171-9335-00104
- Friedrich, R., Panizzi, P., Fuentes-Prior, P., Richter, K., Verhamme, I., Anderson, P. J., Kawabata, S., Huber, R., Bode, W., & Bock, P. E. (2003). Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*, 425 (6957), 535–539. Doi: 10.1038/nature01962.

- Fujikawa, H., & Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23 (3), 260–267. Doi: 10.1016/j.fm.2005.04.005
- Gajewska, J., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2020). Biofilm Formation Ability and Presence of Adhesion Genes among Coagulase-Negative and Coagulase-Positive *Staphylococci* Isolates from Raw Cow's Milk. *Pathogens*, 9 (8), 654. Doi: 10.3390/pathogens9080654
- Garedew, L., Berhanu, A., Mengesha, D., & Tsegay, G. (2012). Identification of gram-negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town and its suburbs, Ethiopia. *BMC Public Health*, 12 (1). Doi:10.1186/1471-2458-12-950
- Goeres, D. M. (2005). Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*, 151 (3), 757–762. Doi:10.1099/mic.0.27709-0
- Gómez, M. I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A., & Prince, A. (2004). *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nature Medicine*, 10 (8), 842-8. Doi: 10.1038/nm1079
- Gu, J., Valdevit, A., Chou, T.-M., & Libera, M. (2017). Substrate effects on cell-envelope deformation during early-stage *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Soft Matter*, 13 (16), 2967–2976. Doi: 10.1039/c6sm02815b
- Guzmán-Luna, P., Nag, R., Martínez, I., Mauricio-Iglesias, M., Hospido, A., & Cummins, E. (2022). Quantifying current and future raw milk losses due to bovine mastitis

on European dairy farms under climate change scenarios. *Science of the Total Environment*, 833, 155149. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155149

Hadrich, J. C., Wolf, C. A., Lombard, J., & Dolak, T. M. (2018). Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 101 (4), 3588–3596. Doi: 10.3168/jds.2017-13840

Hamadi, F., Asserne, F., Elabed, S., Bensouda, S., Mabrouki, M., & Latrache, H. (2014). Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control*, 38, 104–108. Doi: 10.1016/j.foodcont.2013.10.00

Haveri, M., Hovinen, M., Roslöf, A., & Pyörälä, S. (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. Doi: 10.1128/JCM.00769-08

Heidinger, J. C., Winter, C. K., & Cullor, J. S. (2009). Quantitative Microbial Risk Assessment for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus Enterotoxin A* in Raw Milk. *Journal of Food Protection*, 72 (8), 1641–1653. Doi: 10.4315/0362-028x-72.8.1641

Hibbitt, K., Cole, C., & Reiter, B. (1969). Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *Journal of General Microbiology*, 56 (3), 365-371. Doi: 10.1099/00221287-56-3-365

Hillerton, J. E., Boast, D., Davies, D., Ohnstad, I., & Middleton, N. (29-31 January 2003). CHANGES IN MILKING LINER PERFORMANCE WITH AGE. Fifth International Dairy Housing Conference, pp 77 – 79. Doi:10.13031/2013.11605

- Hoffmann, S., & Scallan, E. (2017). Epidemiology, Cost, and Risk Analysis of Foodborne Disease. En C. Dodd (Ed.), T. Aldsworth (Ed.), R. Stein (Ed.), D. Cliver (Ed.) y H. Riemann (Ed.), *Foodborne Diseases* (3rd Edition, pp. 31 – 63). Academic Press. Doi: 10.1016/B978-0-12-385007-2.00002-4
- Hu, C., Xiong, N., Zhang, Y., Rayner, S., & Chen, S. (2012). Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419 (4), 617–620. Doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.057
- Hunt, K. M., Williams, J. E., Shafii, B., Hunt, M. K., Mehre, R., Ting, R., McGuire, M. K., & McGuire, M. A. (2013). Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeed Med*, 8 (1), 105–110. Doi: 10.1089/bfm.2011.0141
- Ibberson, C. 2015. Hyaluronidase in *Staphylococcus aureus* physiology and pathogenesis [Tesis de doctorado]. University of Iowa. Doi: 10.17077/etd.uyknxveb
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, 827965. Doi:10.1155/2014/827965
- Kandpal, S. D., Srivastava, A., & Negi, K. (2012). Estimation of quality of raw milk (Open & branded) by milk adulteration testing kit. *Indian Journal of Community Health*, 24 (3), 188-192. Doi: 10.13170/ajas.6.3.20356

- Kelly, A. L., O'Flaherty, F., & Fox, P. F. (2006). Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal*, 16 (6), 563–572. Doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.019
- Koyama, T., Yamada, M., & M. Matsushashi. (1977). Formation of regular packets of *Staphylococcus aureus* cells. *Journal of Bacteriology*, 129, 1518–1523. Doi: 10.1128/jb.129.3.1518-1523.1977
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, 329 (11), 849–857. Doi: 10.1016/j.crv.2006.07.008
- Latorre, A. A., Van Kessel, J., Karns, J., Zurakowski, M., Pradhan, A., Boor, K., Jayarao, J., Houser, B., Daugherty, C., & Schukken, Y. (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. Doi: 10.3168/jds.2009-2717.
- Latorre, A.A., Van Kessel, J.A.S., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., Adolph, E., Sukhnanand, S. & 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 Journal*, 77 (11), 3676-3684. Doi: 10.1128/AEM.02441-10
- Latorre, A. A., Pachá, P. A., González-Rocha, G., San Martín, I., Quezada-Aguiluz, M., Aguayo-Reyes, A., Bello-Toledo, H., Oliva, R., Estay, A., Pugin, J., & Muñoz, M. A. (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

- Latorre, A. A., Oliva, R., Pugin, J., Estay, A., Nualart, F., Salazar, K., Garrido, N., & Muñoz, M. A. (2022). Biofilms in hoses utilized to divert colostrum and milk on dairy farms: A report exploring their potential role in herd health, milk quality, and public health. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 969455. Doi: 10.3389/fvets.2022.969455
- Lee, S. H. I., Mangolin, B. L. C., Gonçalves, J. L., Neeff, D. V., Silva, M. P., Cruz, A. G., & Oliveira, C. A. F. (2014). Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97 (3), 1812–1816. Doi: 10.3168/jds.2013-7387
- Leitner, G., Krifucks, O., Merin, U., Lavi, Y., & Silanikove, N. (2006). Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 16 (6), 648–654. Doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.020
- Leoney, A., Karthigeyan, S., Asharaf, A. S., & Felix, A. J. W. (2020). Detection and Categorization of Biofilm-forming *Staphylococcus aureus*, *Viridans streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolated from Complete Denture Patients and Visualization Using Scanning Electron Microscopy. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 10 (5), 627–633. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_256_20
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3 (3). Doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014

- Liu, K., Tao, L., Li, J., Fang, L., Cui, L., Li, J., Meng, X., Zhu, G., Bi, C., & Wang, H. (2020). Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Cases of Clinical Bovine Mastitis on Large-Scale Chinese Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 580129. Doi:10.3389/fvets.2020.580129
- Livney, Y. D., Schwan, A. L., & Dalgleish, D. G. (2004). A Study of β -Casein Tertiary Structure by Intramolecular Crosslinking and Mass Spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 87 (11), 3638–3647. Doi:10.3168/jds.s0022-0302(04)73502-x
- Pal, M., Kerorsa, G., Megersa, L., & Kandi, V. (2020). Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of *Staphylococcus Aureus*: A Comprehensive Review. *American Journal of Public Health*, 8 (1), 14-21. Doi: 10.12691/ajphr-8-1-3
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences, CMLS*, 67 (18), 3057–3071. Doi: 10.1007/s00018-010-0389-4
- Marques, S. C., Rezende, J. das G. O. S., Alves, L. A. de F., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R., & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38 (3), 538–543. Doi: 10.1590/s1517-83822007000300029
- Massaglia, J. E., Jr, Lebowitz, C., Fitzgerald, K., Hickok, N. J., Beredjikian, P., & Rivlin, M. (2021). An Evaluation of the Bacterial Adherence to Casting Materials. *Cureus*, 13 (7), e16724. Doi: 10.7759/cureus.16724

- Mistretta, N., Brossaud, M., Telles, F., Sanchez, V., Talaga, P., & Rokbi, B. (2019). Glycosylation of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid is influenced by environmental conditions. *Scientific Reports*, 9 (1). Doi: 10.1038/s41598-019-39929-1
- Monistero, V., Graber, H. U., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Lasso-Rojas, L., Kroemker, V., Wentz, N., Petzer, I. M., Santisteban, C., Runyan, J., Veiga Dos Santos, M., Alves, B. G., Piccinini, R., Bronzo, V., Abbassi, M. S., Said, M. B., & Moroni, P. (2018). *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins*, 10(6), 247. Doi:10.3390/toxins10060247
- Muñoz, M., Acuña, C., Sáez, F., Latorre, A., & León, B. (2018). Antimicrobial resistance profiles of microorganisms isolated from milk samples from clinical mastitis and subclinical-infected quarters in dairy herds from Chile. Páginas 184–185 en *Proceeding of the National Mastitis Council Annual Meeting*.
- Morton, L. H. G., Greenway, D. L. A., Gaylarde, C. C., & Surman, S. B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41 (3-4), 247–259. Doi: 10.1016/s0964-8305(98)00026-2
- Ndahetuye, J. B., Leijon, M., Båge, R., Artursson, K., & Persson, Y. (2021). Genetic Characterization of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Mastitis Cases in dairy Cows in Rwanda. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 751229. Doi: 10.3389/fvets.2021.751229

- Ott, R. L. & Longnecker, M. (2001). *An introduction to statistical methods and data analysis*. (5th Edition., pp 767). Duxbury: Thomson Learning.
- Paape, M. J., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., & Burvenich, C. (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology*, 7 (2), 109–121. Doi: 10.1023/a:1020343717817
- Pachá, P. A., Munoz, M. A., González-Rocha, G., San Martín, I., Quezada-Aguiluz, M., Aguayo-Reyes, A., Bello-Toledo, H., & Latorre, A. A. (2021). Molecular diversity of *Staphylococcus aureus* and the role of milking equipment adherences or biofilm as a source for bulk tank milk contamination. *Journal of Dairy Science*, 104 (3), 3522–3531. Doi: 10.3168/jds.2020-19121
- Pepe, O., Blaiotta, G., Bucci, F., Anastasio, M., Aponte, M., & Villani, F. (2006). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11), 7057–7062. Doi: 10.1128/aem.00198-06
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Seyfert, H. M., Hussen, J., & Schuberth, H.-J. (2018). Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Research in Veterinary Science*, 116, 55–61. Doi: 10.1016/j.rvsc.2017.12.012
- Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S., & Speziale, P. (2017). *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5 (7),166. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00166

- Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2021). The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Frontiers in immunology*, 11, 620339. Doi: 10.3389/fimmu.2020.620339
- Rall, V. L., Vieira, F. P., Rall, R., Vieitis, R. L., Fernandes, A., Candeias, J. M. Jr., Cardoso, K. F., & Araújo, J. P., Jr. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, 132 (3-4), 408–413. Doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.011
- Rosenstein, R., & Götz, F. (2000). Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, 82 (11), 1005–1014. Doi:10.1016/s0300-9084(00)01180-9
- Rysstad, G., & Kolstad, J. (2006). Extended shelf life milk-advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, 59 (2), 85–96. Doi: 10.1111/j.1471-0307.2006.00247.x
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Thorup Cohn, M., Lindqvist, R., & Barker, G. C. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2 (6), 580–592. Doi: 10.4161/viru.2.6.18122
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J., Zweifel, C., & Stephan, R. (2004). Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, 101 (2), 101–107. Doi: 10.1016/j.vetmic.2004.03.016

Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hottel, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020,1-21. Doi: 10.1093/database/baaa062

Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24 (3), 429–438. Doi: 10.5713/ajas.2011.10233

Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., & Singh, Y. (2016). Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian Journal of Microbiology*, 57 (1), 1–10. Doi: 10.1007/s12088-016-0625-1

Singh, S., Bhattacharjee, M., Unni, B., & Kashyap, R. (2023). Detection of Antibiotic Resistance and Biofilm Producing Ability of Staphylococcus Species in Clinical Isolates. *Annals of the National Academy of Medical Sciences*, 59, 104–108. Doi: 10.1055/s-0043-1768461.

Sousa, C., Teixeira, P., & Oliveira, R. (2009). Influence of surface properties on the adhesion of Staphylococcus epidermidis to acrylic and silicone. *International Journal of Biomaterials*, 718017. Doi: 10.1155/2009/718017

Sutra, L., & Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus. *Journal of Medical Microbiology*, 40 (2), 79-89. Doi: 10.1099/00222615-40-2-79

- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R., & Vieira, M. J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22 (2-3), 247–251. Doi: 10.1016/j.fm.2004.03.010
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews Microbiology*, 13 (9), 529–543. Doi: 10.1038/nrmicro3521
- Todd, E. C. D. 2014. Bacteria: *Staphylococcus aureus*. En Y. Motarjemi (Ed.), G. Moy (Ed.), E. Todd (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety* (1st Ed., Vol.1, pp. 530–534). Academic Press. Doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00115-3
- Thrusfield, M., Brown, H., Diggle, P. J., French, N., Howe, K., Kelly, L., O'Connor, A., Sargeant, J. Y Wood, H. (2018). *Veterinary Epidemiology (English Edition)* (4.a ed.). Wiley-Blackwell.
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, 11 (3), 300. Doi: 10.3390/pathogens11030300.
- Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. Doi: 10.3389/fcimb.2012.00012
- Vidal, J. M., Miranda, C. D., de la Fuente, M., Alarcón, M., Aroca, G., Sossa, K., Ruiz, P., & Urrutia, H. (2019). Formation of biofilms of the salmon pathogen *Flavobacterium*

psychrophilum in different surfaces using the CDC biofilm reactor. *Aquaculture*, 734459. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.73

Webber, B., Canova, R., Esper, L. M., Perdoncini, G., Do Nascimento, V. P., Pilotto, F., Dos Santos, L. R., & Rodrigues, L. B. (2015). The Use of Vortex and Ultrasound Techniques for the in vitro Removal of Salmonella spp. Biofilms. *Acta Scientiae Veterinariae*, 43, 1332.

Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., & Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and –independent methods. *PLoS One*, 14 (9), e0222238. Doi: 10.1371/journal.pone.0222238

Wilkinson, B. J., Peterson, P. K., & Quie, P. G. (1979). Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the Staphylococcus aureus capsule: model for the antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers. *Infection and Immunity*, 23 (2), 502-508. Doi: 10.1128/iai.23.2.502-508.1979